

**Université de Montréal**

**L'endostatine et autres marqueurs angiogéniques de la prééclampsie**

**Par  
Sarah Thissier-Lévy**

**Département de Sciences biomédicales  
Faculté de Médecine**

**Mémoire présenté à la Faculté des Etudes Supérieures  
En vue de l'obtention du grade de Maîtrise  
en Sciences Biomédicales  
Option Recherche Clinique Biomédicale (M.Sc.)**

**Avril, 2012**

**©, Sarah Thissier-Lévy, 2012**

**Université de Montréal  
Faculté des Etudes Supérieures et post-doctorales**

**Ce mémoire intitulé :**

**L'endostatine et autres marqueurs angiogéniques de la prééclampsie**

**Présenté par :**

**Sarah Thissier-Lévy**

**A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :**

**Président rapporteur  
Guy Van Vliet**

**Directeur de recherche  
François Audibert**

**Co-directeur  
William Fraser**

**Membre du jury  
Michel Dreyfus**

## RESUME

**OBJECTIF:** Évaluer le rôle de l'endostatine, un nouveau marqueur anti-angiogénique, pour prédire le risque de prééclampsie (PE).

**METHODES:** Il s'agit d'une étude cas témoins nichée dans deux cohortes prospectives. Les échantillons sanguins étaient collectés entre 11 et 17 semaines puis entre 18 et 26 semaines d'aménorrhée. L'hypertension gestationnelle était définie par une tension artérielle supérieure ou égale à 140/90mmHg à 2 reprises. Les cas de prééclampsie étaient définis par une hypertension gestationnelle associée à une protéinurie supérieure ou égale à 0.3 g /24h après 20 semaines de grossesse. La concentration d'endostatine était mesurée par une technique d'ELISA. Les résultats étaient exprimés en multiples de la médiane (MoM) et ajustés pour l'âge maternel, l'âge gestationnel, l'ethnie, et la cohorte d'origine. Une régression logistique était utilisée pour calculer des odds ratios (OR) ajustés et prédire le risque de PE.

**RESULTATS:** Au total nous avons étudié 77 PE et 150 témoins chez des grossesses uniques. Parmi les PE 21 étaient de survenue précoce, avec un diagnostic avant 34 semaines et 41 étaient des PE sévères. Les cas avaient un IMC plus élevé que les témoins et étaient plus souvent Africaines. Les taux médians d'endostatine étaient significativement plus élevés chez les PE que chez les témoins au 1<sup>er</sup> trimestre (94.2 versus 90.7 ng/ml, p=0.004) et 2<sup>ème</sup> trimestre (105.8 versus 99.3 ng/ml p=0.002). Le taux d'endostatine entre 18 et 26 semaines était même plus élevé chez les patientes qui développaient une PE précoce. Lorsque l'endostatine était supérieure au 75<sup>ème</sup> percentile (exprimée en MoM), le OR ajusté était de 1.33 95IC [0.68-2.58] à 11-17 semaines et 1.77 [0.94-3.34] à 18-26 semaines. L'OR ajusté pour les PE précoces était 3.51 [1.18-10.43] entre 11-17 semaines et 2.17 [0.67-7.06] entre 18-26 semaines.

**CONCLUSIONS:** Un taux élevé d'endostatine dès le 1<sup>er</sup> trimestre est associé à une augmentation du risque de PE et surtout d'un risque de prééclampsie précoce. Toutefois l'endostatine seule a une trop faible valeur prédictive pour avoir une utilité clinique.

**MOTS CLEFS :** Prééclampsie, marqueurs angiogénique, endostatine, dépistage

## **ABSTRACT**

**OBJECTIVE:** To evaluate a new anti-angiogenic factor, endostatin, in relation to the risk of preeclampsia (PE).

**STUDY DESIGN:** We performed a case control study nested in two separate prospective cohorts. Serum samples were collected at 11-17 weeks and 18-26 weeks of gestation. Maternal endostatin levels were measured by ELISA. Results were expressed as multiples of the median (MoM) adjusted for maternal age, gestational age, ethnicity, and cohort of origin. Logistic regression was used to calculate adjusted odds ratios (aORs) of PE.

**RESULTS:** A total of 77 PE and 150 controls of singleton pregnancies were studied, including 21 early-onset PE (diagnosis before 34 weeks) and 41 severe PE. Cases had a higher pre-pregnancy BMI and were more likely of African ethnicity than controls. Endostatin levels were significantly higher in women with PE compared to controls at both the first and second trimester (median 94.2 vs. 90.7 ng/ml  $p=0.004$  and 105.8 vs. 99.3 ng/ml  $p=0.002$  respectively). Endostatin levels were even higher in women with early-onset PE. At a cut-off level of 75th percentile of endostatin MoMs, the adjusted ORs for PE were 1.33, 95CI [0.68-2.58] at 11-17 weeks and 1.77 [0.94-3.34] at 18-26 weeks. The aORs for early-onset PE were 3.51 [1.18-10.43] at 11-17 weeks and 2.17 [0.67-7.06] at 18-26 weeks, respectively.

**CONCLUSION:** Higher endostatin levels as early as in the first trimester may indicate an increased risk of subsequent PE, especially early onset PE. However endostatin alone has a poor predictive value for clinical usefulness.

**KEYWORDS:** Preeclampsia, angiogenic biomarker, endostatin, screening

## **TABLE DES MATIERES**

<b>Résumé.....</b>	<b>iii</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>iv</b>
<b>Table des matières.....</b>	<b>v</b>
<b>Liste des tableaux.....</b>	<b>vi</b>
<b>Liste des figures.....</b>	<b>vii</b>
<b>Liste des abréviations.....</b>	<b>viii</b>
<b>Remerciements .....</b>	<b>x</b>
<b>Avant-propos.....</b>	<b>xi</b>
<b>Chapitre I : Introduction .....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre II : Etat des connaissances .....</b>	<b>2</b>
- 2.1 Epidémiologie.....	2
- 2.2 Facteurs de risque .....	5
- 2.3 Complications de la prééclampsie .....	9
<b>Chapitre III : Physiopathologie de l'angiogenèse placentaire .....</b>	<b>12</b>
- 3.1 Physiologie et pathologie de la placentation .....	12
- 3.2 Biomarqueurs impliqués dans la physiopathologie de la placentation...	17
<b>Chapitre IV : Problématique : prédiction de la prééclampsie .....</b>	<b>26</b>
<b>Chapitre V : Article .....</b>	<b>30</b>
- 5.1 Hypothèse de travail .....	30
- 5.2 Abstract .....	32
- 5.3 Introduction.....	33
- 5.4 Study design.....	34
- 5.5 Results.....	36
- 5.6 Comments .....	37
- 5.7 References of article.....	43
<b>Chapitre VI : Conclusion et perspectives futures .....</b>	<b>45</b>
<b>Bibliographie du mémoire.....</b>	<b>48</b>

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Critères de sévérité de la prééclampsie selon la SOGC .....	page 1
Tableau 2. Complications maternelles et néonatales d'après Sibai et al. ....	page 11
Tableau 3. Résumé des biomarqueurs de la prééclampsie.....	page 25
Tableau 4. Tests de dépistage de la prééclampsie identifiés dans la littérature, d'après Conde-Agudelo et al. ....	page 28

### Tableaux de l'article :

<i>Table 1. Characteristics by clinical outcomes.....</i>	<i>page 40</i>
<i>Table 2. Endostatin levels in preeclamptic and unaffected pregnancies.....</i>	<i>page 40</i>
<i>Table 3. Multivariate logistic regression: OR of preeclampsia in association with endostatin MoM &gt;75<sup>th</sup> percentile.....</i>	<i>page 41</i>

## LISTE DES FIGURES

Figure 1. Incidence pour 1000 naissances de l'hypertension gestationnelle et de la prééclampsie ajustée pour l'âge maternel de 1987 à 2004 .....	page 3
Figure 2. Évolution de l'incidence de la prééclampsie selon les différentes ethnies entre 1993 et 2002 .....	page 4
Figure 3. Distribution dans le monde des désordres hypertensifs responsables de décès maternels.....	page 5
Figure 4. Risque de prééclampsie au cours de la deuxième et de la troisième grossesse, en fonction du temps écoulé depuis la première grossesse, chez des femmes sans antécédents de prééclampsie et ayant le même partenaire pour toutes les grossesses.....	page 7
Figure 5. Schéma et histologie du placenta D'après Furuya et al. 2011.....	page 14
Figure 6. Schématisation des symptômes et des relations biochimiques entre la circulation maternelle et le placenta.....	page 16
Figure 7. Évolution de la concentration moyenne du PlGF chez les patients prééclamptiques et non prééclamptiques selon Levine et al.....	page 20
Figure 8.Évolution de la concentration du sFlt1 chez les patientes prééclamptiques et non prééclamptiques selon Levine et al.....	page 22
Figure 9. Schématisation du sFlt1 et sEng d'après Maynard SE et al.....	page 23
<b>Figure de l'article</b>	
<i>Figure 1. Receiver operating characteristic (ROC) curve showing the ability of maternal endostatin concentration with maternal characteristics to predict preeclampsia at 11-17 weeks of gestation compared to maternal characteristics alone.....</i>	<i>page 42</i>

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

AFP : alpha Foeto-Protéine

AOR : Adjusted Odd Ratio

AT1 : Angiotensine 1

AUC: Area Under the Curve

BHCG : Hormone chorionique gonadotrophique

BMI : Body Mass Index

CIVD : Coagulation Intra-Vasculaire Disséminée

ENOS : Oxyde Nitrique

FGF : Fibroblast Growth Factor

HGF : Hepatocyte Growth Factor

HTA: Hypertension Artérielle

IC : Intervalle de Confiance

IMC: Index de Masse Corporelle

INSERM: Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale

IUGR : Intrauterine Growth Restriction

MIROS :Maternal Infant Research on Oxydative Stress

MoM : Multiple de la Médiane

OMS : Organisation Mondiale de Santé

OR : Odds Ratio

PAPP-A : Pregnancy Associated Plasma Protein A

PARIS : Preeclampsia Assessment Risk by Integrated Screening

PE : Prééclampsie



PGI : Prostacycline

PlGF : Placenta Growth Factor

RCIU : Restriction de Croissance Intra-Utérine

ROC : Receiver Operating Characteristic Curve

RPLS : Reversible posterior leukoencephalopathy syndrome

RR : Risque Relatif

Seng : Endoglin soluble

SFlt1 : Soluble fms-like-kinase 1

SOGC : Société des Obstétriciens et Gynécologues du Canada

TGF: Transforming Growth Factor

VEGF : Vasular Endothelial Growth Factor

VEGF-R1, VEGF-R2 : Vascular Growth Factor Receptor 1, 2

X2 : Chi deux

## REMERCIEMENTS

En préambule, je remercie les personnes qui m'ont apporté leur aide et leur soutien dans la réalisation de ce mémoire, et la réussite de cette année universitaire.

Je tiens à remercier tout d'abord Dr François Audibert, mon directeur de recherche pour son accueil chaleureux dans le service, son aide et ses conseils précieux dans la réalisation de ce mémoire. Je le remercie également pour ses encouragements tout au long de cette formation et sa grande disponibilité symbolisée par une porte toujours ouverte dans le service.

Je remercie Isabelle Boucoiran pour son soutien et son aide constante depuis le début de mes démarches pour venir à Ste Justine jusqu'à l'aboutissement de ce travail. Je tiens également à la remercier pour les connaissances qu'elle m'a apportées en statistiques. Merci Isa.

Je remercie également Dr. William Fraser, mon co-directeur sans qui ce projet n'aurait pas vu le jour. Je le remercie pour la confiance qu'il m'a accordée.

Je remercie très sincèrement le Professeur Michel Dreyfus de m'avoir soutenue tout au long de ce projet. Je le remercie d'avoir accepté d'être jury de mon mémoire.

Je remercie Guy Van Vliet d'avoir accepté d'être président rapporteur de mon travail.

Je tiens à remercier sincèrement Isabelle Krauss ainsi que toute l'équipe du service pour leur accueil chaleureux, et qui ont rendu cette année des plus agréables.

Enfin je remercie ma famille, David, mes amis de France et nouveaux amis du Québec de m'avoir entourée tout au long de cette année.

## **AVANT-PROPOS**

Ce mémoire comporte six chapitres traitant des biomarqueurs angiogéniques et antiangiogéniques de la prééclampsie.

Les quatre premiers chapitres ont pour but de faciliter la compréhension du travail réalisé.

Le cinquième chapitre est composé d'un article issu de mon année de recherche effectuée au cours de ma formation en maîtrise de sciences biomédicales à l'université de Montréal sous la direction du Dr. François Audibert et co-direction du Dr. William Fraser.

Cet article a été soumis pour publication à l'American Journal of Obstetrics and Gynecology, et l'abstract a été accepté pour une présentation au congrès de la Society for Maternal-Fetal Medicine en Février 2012.

Le sixième chapitre constitue une discussion des principaux résultats de notre recherche et une conclusion globale de notre projet. Ce chapitre permet également de discuter des perspectives de recherches futures.

## CHAPITRE 1 : DEFINITION

La prééclampsie est une pathologie de la femme enceinte, touchant 2 à 5% des grossesses. C'est une pathologie spécifique à la gestation et à l'espèce humaine. Il n'existe pas de modèle animal. Le diagnostic de prééclampsie est clinique, se manifestant par l'apparition d'une hypertension gestationnelle associée à une protéinurie (protéine  $\geq$  300mg par 24 heures ou une bandelette urinaire  $\geq$  2 croix) à partir de la 20ème semaine de gestation. L'hypertension gestationnelle est définie par une tension artérielle systolique  $\geq$  140 et ou diastolique  $\geq$  90 mmHg à deux reprises et à au moins 6 heures d'intervalle.(1, 2) La définition est cependant légèrement différente pour la SOGC (3) qui définit l'hypertension gestationnelle comme une pression artérielle diastolique  $\geq$  90mmHg sans prendre en compte la pression systolique. La prééclampsie précoce se définit par l'apparition de la maladie avant 34 semaines d'aménorrhée. Pour la SOGC la prééclampsie sévère se définit par une prééclampsie associée à un ou plusieurs critères adverses (3). Notons que la précocité de survenue de la prééclampsie est considérée comme un critère sévère pour la SOGC contrairement aux autres sociétés savantes (4-7).

Tableau 1. Critères de sévérité de prééclampsie pour la SOGC (3).

<ul style="list-style-type: none"> <li>- Prééclampsie précoce débutant avant 34 semaines</li> <li>- Atteinte rénale : Protéinurie <math>&gt;3\text{g}/24\text{h}</math> Albuminémie <math>&lt;20\text{g/l}</math>, Hypercréatininémie</li> <li>- Atteinte neurologique : Céphalées persistantes, Troubles visuels, Eclampsie</li> <li>- Atteinte hépatique : Douleur abdominale ou hypochondre droit persistant, Cytolyse hépatique, Thrombopénie <math>&lt;100\ 000/\text{ml}</math></li> <li>- Œdème pulmonaire</li> <li>- Retentissement fœtal : Oligohydramnios, RCIU, flux diastolique nul ou inversé, Mort fœtale</li> </ul>
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

La prééclampsie est une pathologie multifactorielle, dans laquelle le placenta joue un rôle central. Plusieurs arguments sont en faveur de la nécessité de la présence d'un placenta dans la prééclampsie. En effet il n'a pas été montré de prééclampsie en dehors d'une grossesse, par ailleurs la maladie disparaît après l'ablation du placenta ou après l'arrêt de

fonctionnement d'un placenta lors d'une grossesse gémellaire avec mort in utero spontanée ou provoquée d'un fœtus (8, 9).

Cependant sa survenue est possible en l'absence d'embryon comme en témoigne l'apparition de la maladie sur des grossesses molaires ou en l'absence d'environnement utérin car il a été constaté des prééclampsies sur des grossesses abdominales.(10)

## **CHAPITRE 2 : ETAT DES CONNAISSANCES**

### ***2.1 Epidémiologie***

#### **2.1.1 Incidence et évolution**

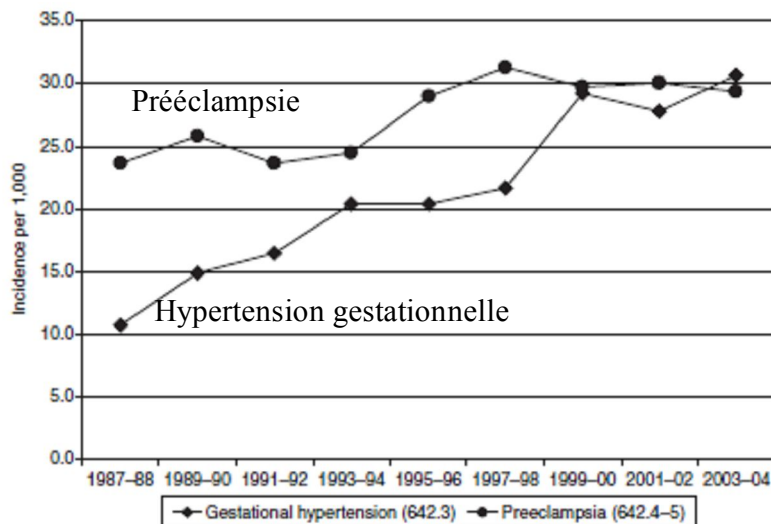
L'incidence des désordres tensionnels pendant la grossesse et notamment de la prééclampsie est variable d'un pays à l'autre. En Alberta, la prévalence de la prééclampsie et de l'hypertension gestationnelle était de 1.7 % et 3.9 % respectivement d'après une étude rétrospective réalisée entre 1991 et 1996 dans 35 hôpitaux en Alberta.(11) Aux USA dans l'Etat de New York entre 1993 et 2002 l'incidence était de 2.4%.(12) En Amérique latine l'incidence est deux fois plus importante selon l'étude rétrospective de Conde-Agudelo et al. réalisée entre 1985 et 1997 (4.9%). (13)

Wallis et al. ont réalisé une étude sur les variations des taux de prééclampsie, d'hypertension gestationnelle et d'éclampsie. Les taux de prééclampsie et d'hypertension gestationnelle ont augmenté de manière significative de 1987 à 2004, passant de 10.5‰ à 29.7‰ et de 25.1 à 32.1‰ respectivement. Cette augmentation peut s'expliquer par une augmentation de la surveillance tensionnelle tout au long de la grossesse. Le taux d'éclampsie a au contraire diminué de 22% sur la même période mais cette tendance n'était pas significative. Cette diminution peut s'expliquer également par l'amélioration de la prise en charge sur les dernières décennies.(14) Cette amélioration s'est faite à différents niveaux :

- le dépistage de l'hypertension est devenu systématique tout au long de la grossesse
- la surveillance des patientes préclamptiques est devenue plus rigoureuse

- l'injection de sulfate de magnésium chez les patientes à haut risque permet de mieux prévenir les risques de crise d'éclampsie.

Figure 1. Incidence pour 1000 naissances de l'hypertension gestationnelle et de la prééclampsie ajustée pour l'âge maternel de 1987 à 2004



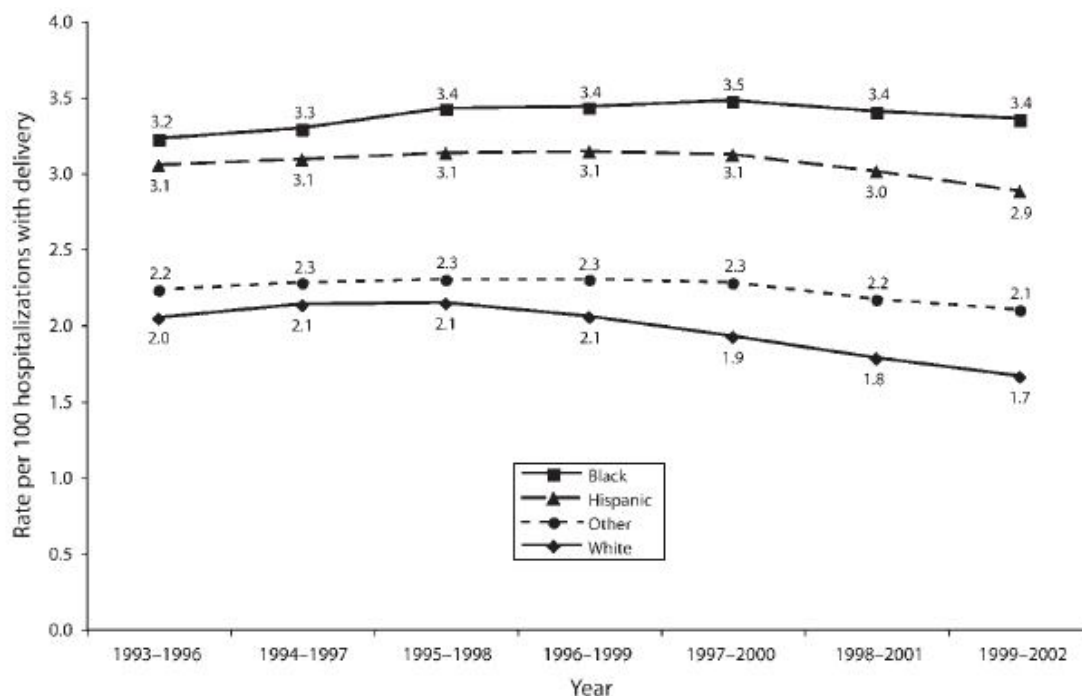
Wallis AB et al. *American Journal of Hypertension* 2008 (14)

### 2.1.2 Disparité ethnique

La fréquence de l'hypertension ne semble pas différer suivant les groupes ethniques en France.(15) Cependant aux États-Unis où la communauté Afro-Américaine est importante, des différences ont été constatées. Tanaka et al. ont montré qu'il existe une différence significative du taux de prééclampsie entre les patientes noires et les patientes blanches dans l'état de New York. Les patientes noires ont un taux de prééclampsie significativement plus élevé que les patientes blanches. Et cette différence augmente entre 1993 et 2002 passant de 1.2% à 1.7%. Les auteurs expliquent cette différence par l'augmentation de l'obésité. En effet des études cliniques ont montré que les patientes obèses, par un mécanisme de résistance insulinaire, avaient un risque plus élevé de développer une prééclampsie. Or la prévalence de l'obésité aux États-Unis a largement augmenté entre 1988 et 2000 et cette augmentation était bien plus importante chez les

patientes noires que chez les patientes hispaniques et blanches (11.5%, 7.2%, 4.4% respectivement).(12)

Figure 2. Évolution de l'incidence de la prééclampsie selon les différentes ethnies entre 1993 et 2002



*Tanaka et al. American Journal of Public Health 2007(12)*

### 2.1.3 Mortalité maternelle

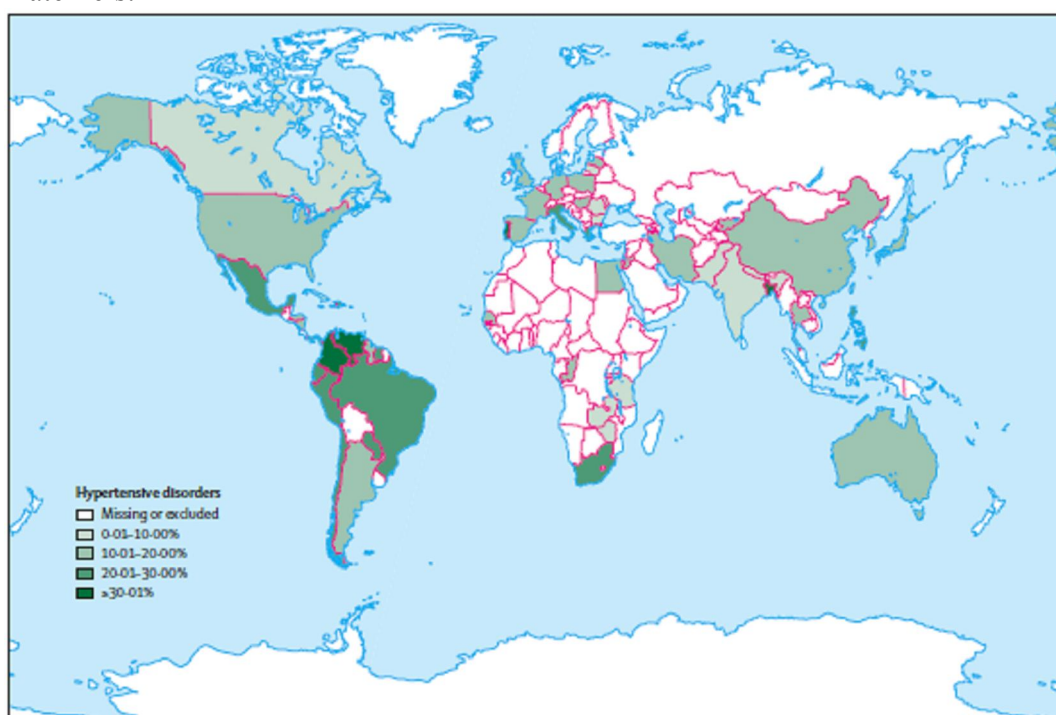
La mortalité maternelle secondaire à une prééclampsie est variable suivant les pays, entre 0.1 et 5 pour 1000 cas. Cette mortalité survient principalement chez les prééclampsies sévères compliquées d'un HELLP syndrome.(16)

La mortalité maternelle en France de 1996 à 2002 selon un rapport de l'INSERM est estimée entre 9 et 13 décès pour 100 000 naissances vivantes. Les complications de l'hypertension constituent la deuxième cause obstétricale responsable de 12% des décès maternels après les hémorragies (21%). Un rapport d'experts a considéré comme évitables 43% des décès causés par l'HTA.(17) Dans une méta-analyse en 2006 Khan et

al montrent que les pays d'Amérique latine et des Caraïbes ont le taux de mortalité maternel lié aux désordres hypertensifs le plus élevé (25.8%) comparés aux pays développés (16.1%), d'Afrique (9.1%), et d'Asie (9.1%).(18)

L'éclampsie est un événement devenue rare (0.5 à 1 pour 1000 naissances), mais elle reste grave et assortie d'une mortalité maternelle de 5%.(19)

Figure 3. Distribution dans le monde des désordres hypertensifs responsables de décès maternels.



*Khan et al. Lancet 2006(18)*

## 2.2 Facteurs de risque de la prééclampsie

Dans une récente revue systématique, Duckitt résume les principaux facteurs de risque de la prééclampsie.(20)

### 2.2.1 Les âges extrêmes

Selon la méta-analyse de Duckitt les patientes âgées de plus de 40 ans ont un risque 2 fois plus important de développer une prééclampsie.(20) Selon Saftlas *et al.* le risque de



prééclampsie augmente de 30% chaque année après l'âge de 34 ans.(21) Certains auteurs ont aussi mis en évidence une augmentation du risque chez les patientes de moins de 25 ans. Wallis et al compare l'âge des patientes prééclamptiques, et montre que les patientes de moins de 24 ans ou de plus de 35 ans ont un risque constant et significativement plus élevé de développer une prééclampsie comparé aux patientes âgées de 30 à 34 ans. Il montre également que les patientes les plus à risque sont les patientes de moins de 20 ans (OR = 1.73 IC95% 1.57-1.90).(14) De même pour Tanaka *et al.* les taux de prééclampsie les plus élevés étaient chez les patientes âgées de 15-17 ans et de 45-54 ans.(12)

### 2.2.2 Parité et primipaternité

La nulliparité est un facteur de risque bien connu de la prééclampsie. Selon la revue systématique de Duckitt la nulliparité triplait le risque dans 3 études de cohortes (RR : 2.91 IC95% 1.28-6.61). Ce risque était conservé après un ajustement pour l'âge, l'IMC, le tabagisme, et le niveau social. (20) Ce facteur de risque était mis en évidence également dans la revue systématique de Luo, avec un odd ratio de 2.4 (IC95% 2.16-2.71) (22). D'autres auteurs vont plus loin en parlant du risque de la primipaternité (première grossesse du couple et non simplement de la mère), allant dans le sens d'une maladie du « jeune couple ». (23, 24) Dans l'étude cas-témoins de Merviel et al. la primipaternité multipliait le risque de prééclampsie de 3,5 fois comparativement à la multipaternité (OR : 3,55 IC95% 2.13-5,83).(24)

### 2.2.3 Antécédent de prééclampsie

Les patientes ayant un antécédent de prééclampsie ont un risque sept fois plus élevé que les patientes sans antécédent. Une histoire familiale de prééclampsie multiplie également le risque par trois.(20)

### 2.2.4 Grossesse multiple

D'après 5 cohortes répertoriées par Duckitt une grossesse multiple a un risque 3 fois plus élevé de développer une prééclampsie.(20)

### 2.2.5 Antécédents médicaux

Lorsqu'une femme enceinte a une pathologie préexistante telles qu'une hypertension, un diabète, une néphropathie chronique, un lupus et notamment lorsqu'elle présente des anticorps anti phospholipides, son risque de développer une prééclampsie est augmenté d'un facteur 9. (20)

### 2.2.6 L'obésité

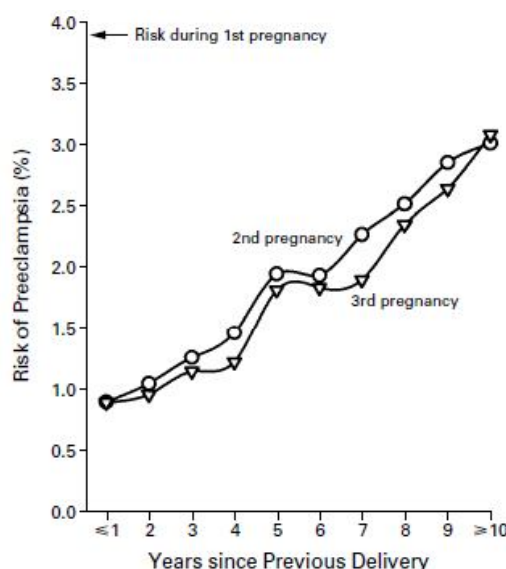
L'obésité est facteur de risque bien connu dans la prééclampsie. Dans la meta-analyse de Duckitt, toutes les études montraient la même tendance. Une étude montrait un risque multiplié par 4 lorsque l'IMC était supérieur à 35 avant la grossesse.(20)

### 2.2.7 L'intervalle temps entre les grossesses.

Une étude Norvégienne rétrospective entre 1967 et 1998 met en évidence l'intervalle temps entre les grossesses comme facteur de risque.

Plus le temps passe entre la 1<sup>ère</sup> grossesse et la seconde grossesse plus le risque de développer une prééclampsie augmente et se rapproche du risque d'une nullipare. Au-delà de 10 années le risque est semblable à celui d'une nullipare. Par ailleurs après ajustement pour le changement de partenaire, l'âge maternel, un antécédent de prééclampsie, et l'année d'accouchement, le risque de prééclampsie augmentait de 1.12 (IC95% 1.11-1.13) pour chaque année avant une deuxième grossesse.(25)

Figure 4. Risque de prééclampsie au cours de la deuxième et de la troisième grossesse, en fonction du temps écoulé depuis la première grossesse, chez des femmes sans antécédents de prééclampsie et ayant le même partenaire pour toutes les grossesses.



*Skjaerven R 2002(25)*

Selon cette même étude, le changement de partenaire ne semble pas être un facteur de risque après ajustement pour l'intervalle de temps entre grossesse.

#### 2.2.8 Facteurs paternels

Le père semble jouer un rôle dans la survenue de la prééclampsie. Lorsqu'il a été à l'origine d'une grossesse prééclamptique cela double le risque de provoquer une prééclampsie chez une femme différente (OR= 1.8 IC95% 1.2-2.6).(26)

#### 2.2.9 La migraine

Un nouveau facteur de risque de la prééclampsie semble être la migraine. Il n'y a pas encore de lien de cause à effet bien défini d'autant plus que la symptomatologie d'une prééclampsie sévère peut mimer celle de la migraine avec la présence de céphalées importantes et parfois l'apparition d'un scotome. Cependant dans une revue systématique en 2006, 8 études sur 10 avaient une association statistiquement significative entre la migraine et la prééclampsie.(27) Récemment une étude cas-témoin au Pérou a montré une forte association entre l'apparition d'une prééclampsie et des antécédents de migraine avant la grossesse (OR=3.5, IC95% 1.9-6.4). (28)

#### 2.2.10 Tabagisme

Conde-Agudelo dans une méta-analyse en 1999 a regroupé 800000 patientes mettant ainsi en évidence un risque relatif de prééclampsie de 0.68 pour les patientes fumeuses.(29) Il n'y a pas d'explication claire à l'heure actuelle, mais l'hypothèse apporté par certains auteurs est que le tabac est un facteur angiogénique et un inhibiteur des marqueurs anti-angiogéniques.(30, 31) Dans l'étude de Jeyabalan portant sur 993 grossesses à haut risque (diabétique, hypertension chronique, grossesse multiple, antécédent de prééclampsie) de prééclampsie le PlGF, marqueur angiogénique, était significativement plus haut chez les patientes fumeuses comparées aux non fumeuses parmi les patientes diabétiques. Ce résultat valait également pour les patientes fumeuses

comparées aux non fumeuses parmi celles qui présentaient une histoire familiale de prééclampsie. L'endogline soluble, marqueur anti-angiogénique, était significativement plus bas chez les fumeuses que chez les non-fumeuses avec une grossesse multiple, ou avec un diabète, mais ce n'était pas le cas pour le soluble fms-like-kinase-1, également un marqueur anti-angiogénique, ou la différence n'était pas significative.(32)

### 2.2.11 Génétique

Avoir un antécédent familial de prééclampsie semble augmenter le risque de faire une prééclampsie. Selon l'étude prospective de Cincotta et al. portant sur 368 primipares, les patientes dont la mère avait fait une prééclampsie avaient un risque 3.4 fois plus élevé de faire à leur tour une prééclampsie comparativement aux patientes sans antécédent familiaux de prééclampsie (IC 95% 1.5-7.6).(33) La mutation des gènes de l'angiotensine comme le M235T semble être associée à la diminution de la dilatation des artères spiralées maternelles.(34, 35)

Tous ces facteurs de risques sont additifs. Par exemple dans l'étude multicentrique de Sibai une femme nullipare avec une pression systolique de 134 mmHg, avec un surpoids en début de grossesse (140% au-dessus du poids attendu), qui ne fume pas, a un risque de prééclampsie estimé à 20%. A contrario si on imagine une patiente dont la pression systolique est de 95 mmHg, sans surpoids, fumeuse, et multipare son risque est estimé à 1.7%.(36)

## ***2.3 Complications de la prééclampsie***

La prééclampsie se complique dans 3 à 5 % des cas. Les complications sont d'ordre maternel et fœtal. Ces dernières peuvent survenir pendant la grossesse, pendant l'accouchement et jusqu'à quelques jours après l'accouchement, même si la délivrance diminue considérablement les risques de complications maternelles.

### **Complications maternelles**

### 2.3.1 L'éclampsie

L'éclampsie est définie par des crises convulsives tonico-cloniques secondaires à un œdème cérébral compliquant la prééclampsie.

### 2.3.2 Le syndrome de HELLP (Hemolysis, Elevated Liver enzymes, Low Platelets)

Il associe une hémolyse aiguë (présence de schizocytes), une élévation des transaminases et des gamma-GT, une thrombopénie périphérique. Il s'y associe la survenue d'une douleur épigastrique et de l'hypochondre droit pouvant traduire un hématome sous-capsulaire du foie. Le Hellp syndrome est secondaire aux lésions endothéliales et aux thrombi de fibrine qui se forment dans la circulation hépatique (37).

### 2.3.3 La Coagulation Intra-Vasculaire Disséminée (CIVD)

La CIVD associe une élévation des D-dimères, une thrombopénie, un allongement du temps de Quick avec une diminution du facteur V, et une diminution du fibrinogène.

### 2.3.4 L'œdème pulmonaire

L'œdème pulmonaire survient en cas de cardiopathie sous-jacente ou de rétention hydro-sodée trop importante. Cette complication peut se compliquer d'un arrêt cardiaque hypoxique.

### 2.2.5 L'insuffisance rénale aiguë

Les anomalies histologiques sont de deux types : nécrose tubulaire aiguë et/ou thrombose intra-vasculaire associée aux lésions d'endothéliose glomérulaire caractéristiques des lésions de néphropathie gravidique. Habituellement la récupération de la fonction rénale est totale en absence de nécrose corticale.

## **Complications Fœtales**

La dysfonction placentaire peut entraîner chez le fœtus une nutrition et oxygénation insuffisante conduisant à des possibles retards de croissance intra-utérin et dans des cas rares au décès.(1) Le seul traitement curatif de la prééclampsie étant l'arrêt de la grossesse, des formes précoces et sévères de la maladie nécessitent alors des

accouchements prématurés avec les complications fœtales de la prématurité que cela génère.

Tableau 2. Complications maternelles et néonatales d'après Sibai et al.(2)

<b>Complications maternelles</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Hématome rétroplacentaire 1-4%</li> <li>- CIVD/Hellp syndrome 10-20%</li> <li>- Œdème pulmonaire 2-5%</li> <li>- Insuffisance rénale aigue 1-5%</li> <li>- Eclampsie &lt;1%</li> <li>- Hématome sous-capsulaire du foie &lt;1%</li> <li>- Décès maternel (rare)</li> </ul>
<b>Complications néonatales</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Prématurité 15-67%</li> <li>- Retard de croissance intra-utérin 10-25%</li> <li>- Séquelles neurologiques &lt;1%</li> <li>- Décès néonatal 1-2%</li> </ul>

CIVD : Coagulopathie ischémique vasculaire disséminée

Hellp syndrome : Association d'une hémolyse, d'une thrombopénie, et d'une cytolyse hépatique

### **Complications à long terme**

Une prééclampsie sévère peut engendrer des lésions irréversibles telles qu'une nécrose corticale aiguë au niveau rénal, ou une hémorragie cérébrale. D'une manière générale une prééclampsie nécessite une surveillance de la pression artérielle car ces patientes sont plus à risque de développer une hypertension essentielle. Plusieurs auteurs ont montré que le risque d'hypertension essentielle était multiplié par 3 dans les 10 premières années suivant la prééclampsie.(38, 39) Dans la revue systématique de Bellamy et al. portant sur plus de 3 400 000 femmes les auteurs montraient que les patientes avec un antécédent de prééclampsie avaient un risque 3 fois plus élevé de mourir d'un accident cérébro-vasculaire dans les 10 années suivant la prééclampsie. Ce risque était beaucoup plus augmenté lorsque la prééclampsie avait été diagnostiquée avant 37 semaines (RR=5,08

IC95% 2.09-12.35) comparé au risque des prééclampsies diagnostiquées après 37 semaines (RR=0.98 IC95% 0.50-1.92). Dans cette même étude, le risque de thrombose veineuse était également augmenté d'un facteur 2 moins de 5 ans après une prééclampsie. En ce qui concerne le cancer du sein il ne semblait pas y avoir de différence de risque.(39)

## **CHAPITRE III : PHYSIOPATHOLOGIE DE L'ANGIOGENESE PLACENTAIRE**

### ***3.1 Physiologie et pathologie de la placentation***

La physiopathologie de la prééclampsie est complexe et reste encore imparfaitement connue. Cependant il est maintenant établi que la prééclampsie est une maladie de l'endothélium dont l'origine est placentaire. Le placenta joue un rôle central dans cette pathologie comme le démontre l'amélioration spectaculaire et rapide des signes cliniques après la délivrance. La placentation dite « hémochoriale » a besoin d'une connexion entre le placenta et les vaisseaux maternels. Ces vaisseaux maternels doivent avoir un calibre suffisant pour permettre un bon flux sanguin et ainsi permettre une vascularisation suffisante de l'embryon. La placentation va se faire par une invasion trophoblastique des structures maternelles.

#### **3.1.1 Défaut d'invasion trophoblastique**

On distingue 2 phases d'invasion trophoblastique. Quelques jours après la fécondation, le blastocyste a migré dans la cavité utérine. Le cytotrophoblaste en périphérie du blastocyste se différencie en syncytiotrophoblaste qui a des propriétés très invasives

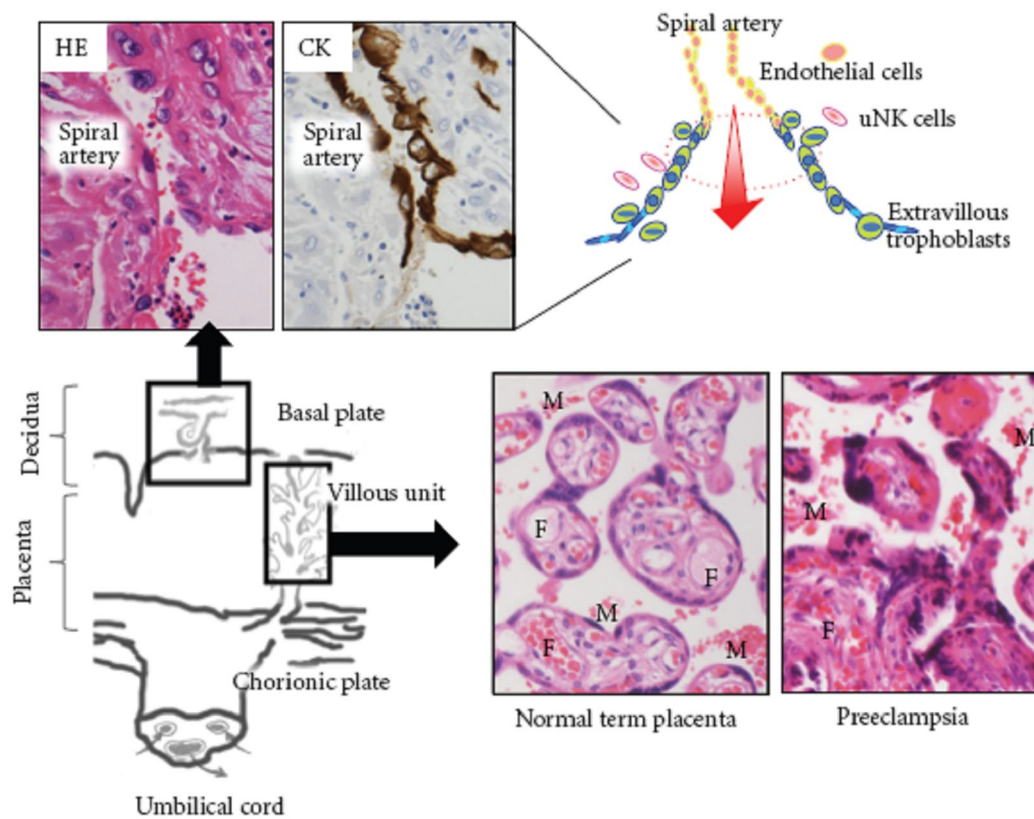
permettant au blastocyste de s'implanter dans la paroi interstitielle de l'utérus. Il s'agit de la première phase d'invasion trophoblastique.

La deuxième phase correspond à l'invasion des artères spiralées jusqu'au tiers du myomètre par le trophoblaste. Ce processus a lieu entre 15 et 18 semaines et engendre la destruction de l'endothélium et de la musculature. En effet au cours de cette invasion trophoblastique, la limitante élastique interne et les cellules musculaires lisses du média sont détruites et remplacées par les cellules trophoblastiques qui acquièrent un phénotype pseudo-endothélial. Zhou et al ont suggéré qu'au cours de la placentation normale les cytotrophoblastes développent un programme de mimétisme vasculaire.(40) Les cellules du trophoblaste qui pénètrent la paroi des artères spiralées acquièrent des propriétés des cellules endothéliales vasculaires et leurs marqueurs de surface. Ces artères modifiées perdent alors leur capacité à se vasoconstricter et deviennent atones. Leur diamètre peut ainsi être augmenté (de 4 à 6 fois comparé à une femme non enceinte).

Lors de la prééclampsie cette invasion est fortement altérée.(41) L'invasion trophoblastique étant incomplète les artères spiralées conservent leur assise musculo-élastique. En effet, les cellules endothéliales ne sont pas remplacées par les trophoblastes et la couche de cellules musculaires-lisse n'est pas remaniée. Les artères utérines conservent leur potentiel vasoconstricteur et leur diamètre petit.(42) Cette invasion trophoblastique défectueuse n'est pas spécifique de la prééclampsie et a également été constatée lors de restriction de croissance fœtale isolée.(43, 44)



Figure 5. Schéma et histologie du placenta D'après Furuya et al. 2011. (45)



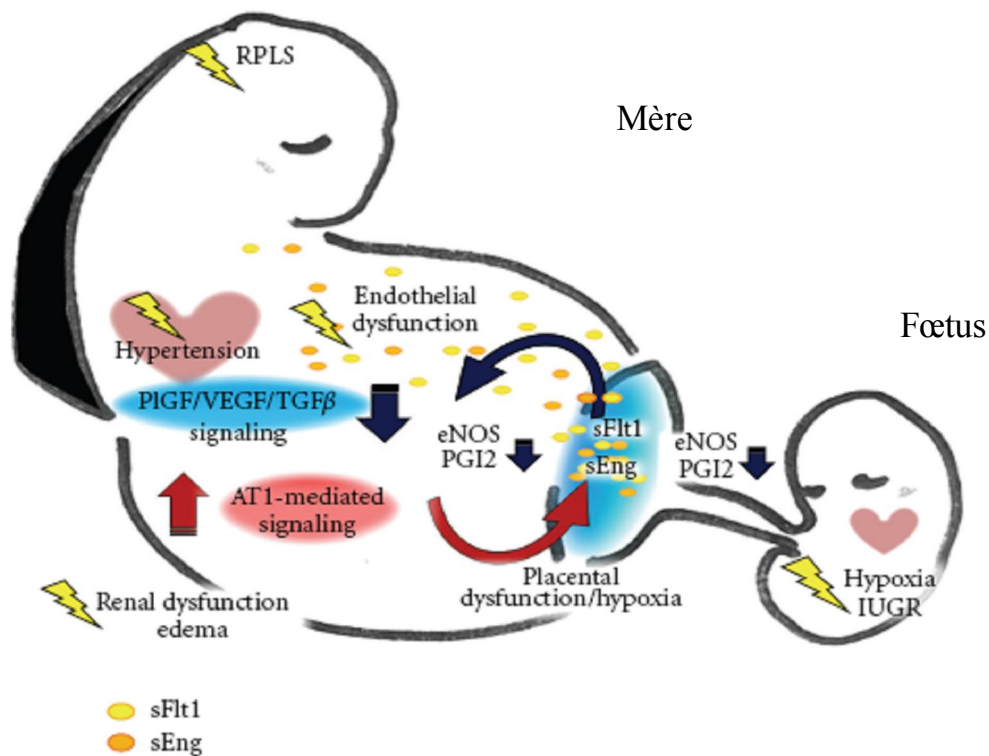
### 3.1.2 Hypoxie placentaire : conséquence d'un défaut d'invasion trophoblastique

L'hypoxie placentaire semble faire le lien entre la mauvaise insertion placentaire et la dysfonction endothéliale. Le stress oxydatif placentaire est responsable d'une augmentation de l'apoptose placentaire et de la libération de débris placentaires apoptotiques dans la circulation maternelle tels que des radicaux libres, et des lipides oxydés. Ce qui engendrerait de l'athérose aiguë du côté placentaire et des lésions vasculaires endothéliales du côté maternel.(46)

### 3.1.3 Dysfonctionnement de l'endothélium maternel responsable des signes cliniques

La diminution de la perfusion placentaire, secondaire au mauvais remodelage vasculaire utérin engendre progressivement une dysfonction placentaire. Les symptômes cliniques de la prééclampsie sont la conséquence d'une dysfonction endothéliale généralisée. En effet les diverses substances placentaires déversées dans la circulation maternelle, lèsent l'endothélium vasculaire déclenchant une réaction inflammatoire systémique.(1) La grossesse normale s'accompagne d'une activation modérée de la réponse inflammatoire secondaire à la libération placentaire normale de débris trophoblastiques lors de leur apoptose physiologique. Mais lors d'une prééclampsie l'apoptose des trophoblastes est beaucoup plus intense augmentant considérablement la libération de débris trophoblastiques dans le sang maternel.(47)

Figure 6. Schématisation des symptômes et des relations biochimiques entre la circulation maternelle et le placenta.(45)



AT1 : Angiotensine 1. Une production excessive d'AT1 et une migration insuffisante des cellules trophoblastiques rend le placenta hypoxique. En réponse les villosités placentaires produisent sFlt1, sEng et autres cytokines pro-inflammatoires qui sont ensuite libérés dans la circulation maternelle engendrant une dysfonction endothéliale systémique chez la mère et les symptômes cliniques (hypertension, dysfonction rénale..).

PGI 2 : Prostacycline  
eNOS : Oxyde nitrique

Vasodilatateurs, dont l'expression est inhibée par sEng.

RPLS : Reversible posterior leukoencephalopathy syndrome, ce syndrome maternel se manifeste par des céphalées, des troubles oculaires, et des convulsions. Des lésions peuvent être visibles sur une IRM.

IUGR : Intrauterine growth restriction. L'hypoxie placentaire engendre une diminution des échanges foeto-placentaires, puis une restriction de croissance fœtale.

### ***3.2 Biomarqueurs impliqués dans la physiopathologie de la placentation***

#### **3.2.1 Marqueurs foeto-placentaires**

Les marqueurs foeto-placentaire sont nombreux. Notre recherche étant axée sur les biomarqueurs angiogéniques et anti-angiogéniques nous ne développerons que les principaux marqueurs foeto-placentaires.

##### **1. Hormone chorionique gonadotrophique (HCG)**

La HCG est une glycoprotéine formée de deux sous-unités alpha et beta et est sécrétée par le cytotrophoblaste et syncytiotrophoblaste dès la fécondation et avant la nidation. Cette hormone devenant détectable dès le 9<sup>ème</sup> jour de la fécondation augmente jusqu'à la 10<sup>ème</sup> semaine. A partir de la 20<sup>ème</sup> semaine elle diminue pour maintenir un plateau jusqu'à la fin de la grossesse. Le rôle essentiel de cette protéine est de conserver le corps jaune fonctionnel jusqu'à la mise en place du placenta qui prendra le relais vers la 7<sup>ème</sup> semaine. Il semble qu'il y ait une association entre l'augmentation de la bHCG au 2<sup>ème</sup> trimestre et l'apparition de la prééclampsie.(48-50)

##### **2. Pregnancy Associated Plasma Protein A (PAPP-A)**

La PAPP-A est une métalloglycoprotéine sécrétée par le placenta qui permet et joue un rôle dans la prolifération trophoblastique. Son taux augmente dans la circulation maternelle jusqu'à la fin de la grossesse. La PAPP-A est utilisé en combinaison avec la bHCG et la clarté nucale comme marqueur de trisomie 21. Il a été observé qu'une

diminution significative de la PAPP-A dans le sang maternel dès le 1<sup>er</sup> trimestre était associée à l'apparition d'une prééclampsie.(51, 52)

### 3. Alpha-Foetoprotéine (aFP)

L'aFP est une glycoprotéine qui contrairement à la bHCG n'est pas sécrétée par le placenta mais par le fœtus. Dans un premier temps elle est produite par la vésicule vitelline, puis par le foie et le tube digestif fœtal qui prennent ensuite le relais. Elle atteint un taux maximal vers la 12<sup>ème</sup> semaine et diminue à partir de la 30<sup>ème</sup> semaine de grossesse. Il n'a pas été retrouvé d'association significative entre le taux d'aFP et la survenue de prééclampsie.(48, 49) En revanche une augmentation sérique maternelle de l'hormone semble être associée à une restriction de croissance.(53)

#### 3.2.2 Marqueurs non angiogéniques et anti-angiogéniques

Il est maintenant admis que la prééclampsie résulte en partie d'un déséquilibre entre des facteurs angiogéniques et anti-angiogéniques. En réponse à un environnement ischémique et/ou hypoxique le placenta libère des facteurs vasoactifs qui semblent être responsables de la dysfonction endothéliale importante au cours de la prééclampsie. Environ à 3 semaines d'aménorrhée les facteurs angiogéniques, exprimés par le placenta contrôlent la formation des vaisseaux placentaires.(54) Le lit capillaire va ainsi s'accroître jusqu'à la 26<sup>ème</sup> semaine d'aménorrhée. Parmi les marqueurs angiogéniques exprimés par le placenta, les plus étudiés au cours de ces dernières années sont le Placenta Growth Factor (PlGF) et le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). Les marqueurs anti-angiogéniques les plus étudiés sont le Soluble fms-like kinase-1 (sFlt1) et l'endogline soluble (sEng). Nous ferons également une revue de la littérature sur le marqueur principal de notre étude, l'endostatine.

#### Marqueurs angiogéniques

Les marqueurs angiogéniques sont aussi appelés facteurs de croissance angiogéniques, ils sont produits et localisés dans le placenta humain. Il s'agit du *Fibroblast growth factor* (FGF), le *placenta growth factor* (PlGF), le *hepatocyte growth factor* (HGF), et le

*vascular endothelial growth factor* (VEGF). Les marqueurs les mieux étudiés jusqu'à aujourd'hui sont le VEGF et le PlGF. Leurs récepteurs ont également été localisés dans le placenta humain.

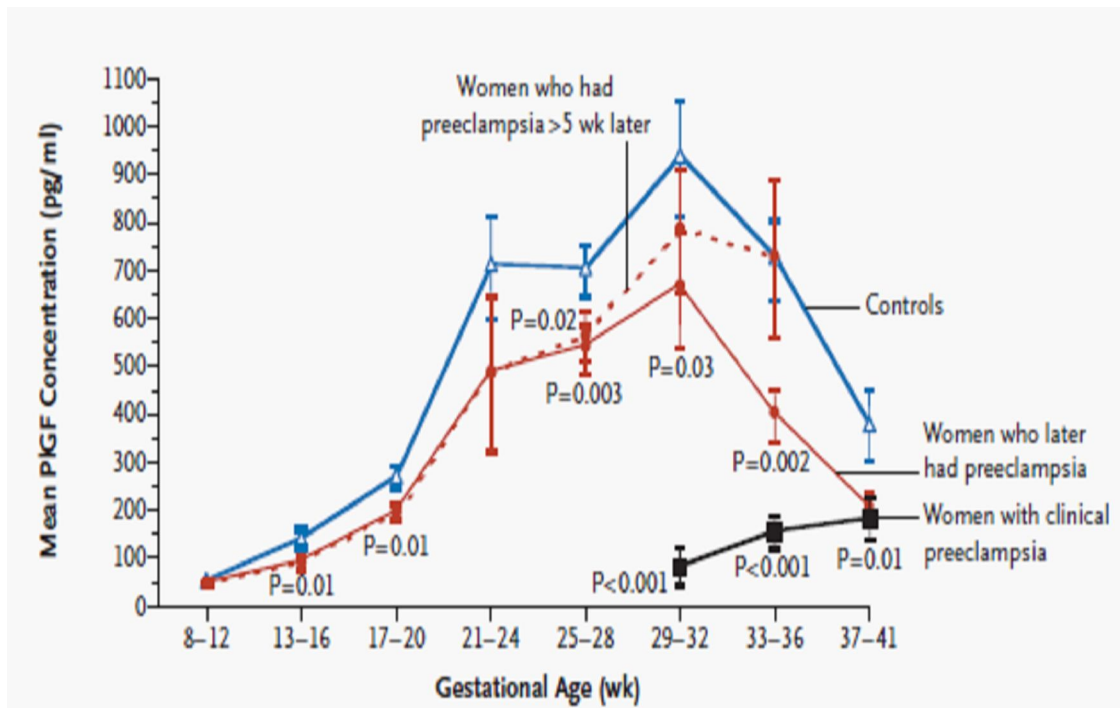
### 1. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

De nombreuses études ont montré que VEGF et ses deux récepteurs, VEGF-R1 et VEGF-R2 (appelé aussi Flt-1 et Flk-1/KDR respectivement) sont les facteurs de croissance angiogéniques clefs dans les conditions angiogéniques et pathologiques de la placentation.(55) Ces facteurs de croissance sont libérés dans la circulation maternelle dès la 6<sup>ème</sup> semaine de gestation et diminuent au début du 3<sup>ème</sup> trimestre. La transcription du VEGF est induite par le facteur 1, lui même étant induit par l'hypoxie physiologique produit par le placenta. Lorsque le VEGF se couple à son récepteur VEGF-R2 cela induit la prolifération des cellules endothéliales et couplé au VEGF-R1 cela stimule la formation des tubes endothéliaux. (56, 57)

### 2. Placental Growth Factor (PlGF)

Le PlGF est une hormone de croissance placentaire, qui stimule la prolifération et la migration des cellules endothéliales. Au cours d'une grossesse normale le PlGF augmente jusqu'au 3<sup>ème</sup> trimestre et diminue autour de la 30ème semaine. Inversement les taux de sFlt1 sont stables jusqu'au 3ème trimestre et augmentent de 33 à 36 semaine, cette augmentation correspond à la diminution du PlGF libre. Levine et al. (58) dans une étude cas-témoins, mettaient en évidence une diminution significative du PlGF au 2<sup>ème</sup> trimestre chez les patientes prééclampsiques comparées aux témoins. Ces résultats étaient en accord avec ceux d'autres auteurs. (30, 59) Deux ans plus tard, Levine et al. (60) mettaient en évidence un ratio sFlt1/PlGF significativement augmenté au 2<sup>ème</sup> trimestre chez les patientes qui développaient une prééclampsie.

Figure 7. Évolution de la concentration moyenne du PIGF chez les patients prééclamptiques et non prééclamptiques selon Levine et al.(58)



### 3. Transforming growth factor beta (TGF-B)

Le TGF-B est un autre facteur de croissance qui semble également être un facteur très important dans la régulation de l'invasion trophoblastique

### 4. Les molécules d'adhésion

Ces molécules d'adhésion jouent un rôle important dans la migration des cellules trophoblastiques. Il s'agit de VE-cadherin, VCAM-1, PECAM-1, αVβ1, αVβ4. Si ces molécules sont absentes la migration trophoblastique est défectueuse.

Des études ont suggéré que la pression en oxygène a une action sur ces molécules d'adhésion. L'hypoxie modifierait les intégrines présentes à la surface des trophoblastes, réduisant ainsi leur capacité d'invasion. (61, 62)

### **Marqueurs anti-angiogéniques**

Comme nous venons de le voir les facteurs de croissance (VEGF, PlGF, TGF- $\beta$ ), en se couplant à leurs récepteurs (VEGF-R1, VEGF-R2), deviennent indispensables au bon déroulement de l'angiogénèse placentaire.

Il a été montré que des récepteurs solubles, en se fixant aux molécules angiogènes se comportaient comme des molécules anti-angiogéniques. En effet ces récepteurs solubles semblent neutraliser l'action biologique des VEGF, PlGF, et TGF- $\beta$ , indispensable au maintien de l'intégrité de la fonction endothéliale. Il en résulte alors une chute de la production de NO synthase qui est normalement responsable de la production de NO vasodilatateur. L'inhibition de la NO synthase entraîne une vasoconstriction, une souffrance cellulaire et la dysfonction endothéliale.

Ces récepteurs solubles sont *soluble fms-like kinase-1* (sFlt1 ou sVEGF-R1), et *soluble endoglin* (sEng).

#### 1. Soluble fms-like kinase-1 (sFlt1)

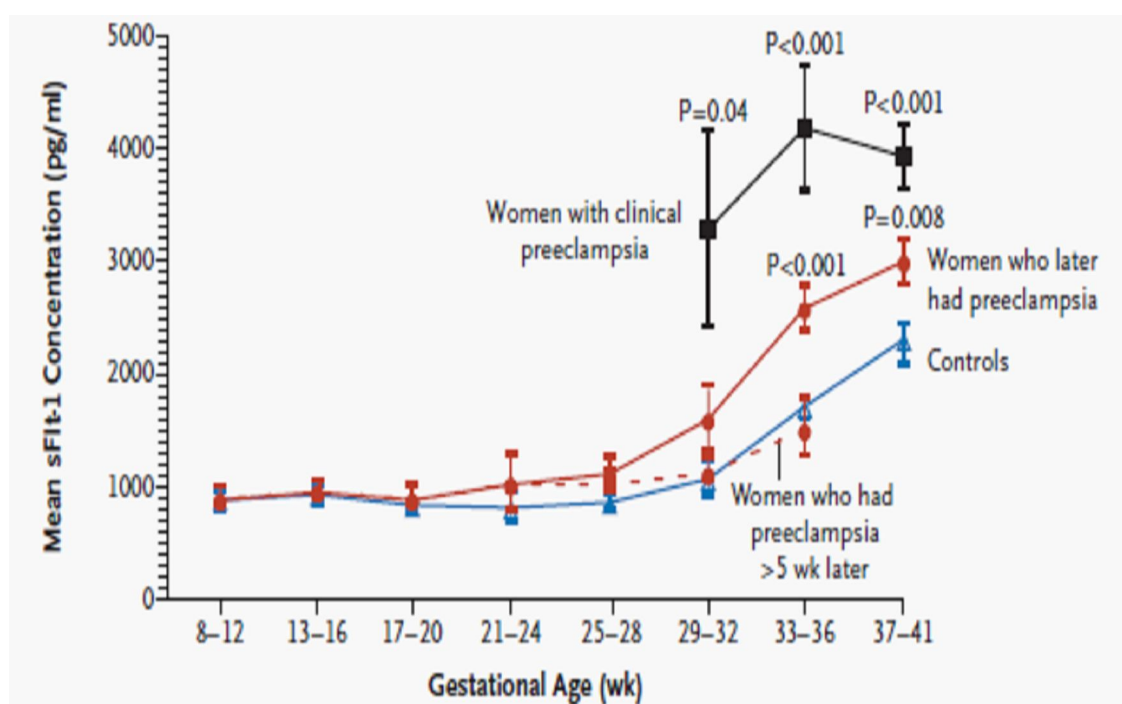
Soluble fms-kinase-1 (sFlt1) est la protéine anti-angiogénique identifiée comme la plus prometteuse à l'heure actuelle.(58, 63).

Connue aussi sous le nom de sVEGFR-1, sFlt1 est une forme tronquée du récepteur Flt1, qui neutralise l'action pro-angiogénique à la fois du VEGF et du PlGF. Le placenta hypoxique libère sFlt1 dans la circulation maternelle qui se lie aux molécules angiogéniques, VEGF et PlGF ce qui prive l'endothélium vasculaire maternel de ces facteurs angiogéniques et atténue ainsi la formation de nouveaux vaisseaux et la maturation des vaisseaux déjà créés.(30) Une augmentation de sFlt-1 s'accompagne d'une diminution de VEGF et PlGF.(64) Il a été montré que les patientes atteintes de prééclampsie avaient des taux élevés en sFlt-1 au 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> trimestres comparées aux femmes sans prééclampsie.(58, 65-67) Une revue de la littérature en 2007 rapporte une élévation statistiquement significative du s-Flt1 après 25 semaines d'aménorrhée chez les patientes prééclamptiques sévères comparées aux grossesses normales.(64) Pourtant, dans



une récente revue systématique sur le taux de sFlt-1 dosé au 1<sup>er</sup> trimestre, et où les études cas-témoins étaient exclues, les taux de sFlt-1 étaient là aussi généralement plus élevés chez les femmes qui développaient une prééclampsie mais ces résultats n'étaient pas statistiquement significatifs.(68)

Figure 8.Évolution de la concentration du sFlt1 chez les patientes prééclampsiques et non prééclampsiques selon Levine et al.(58)



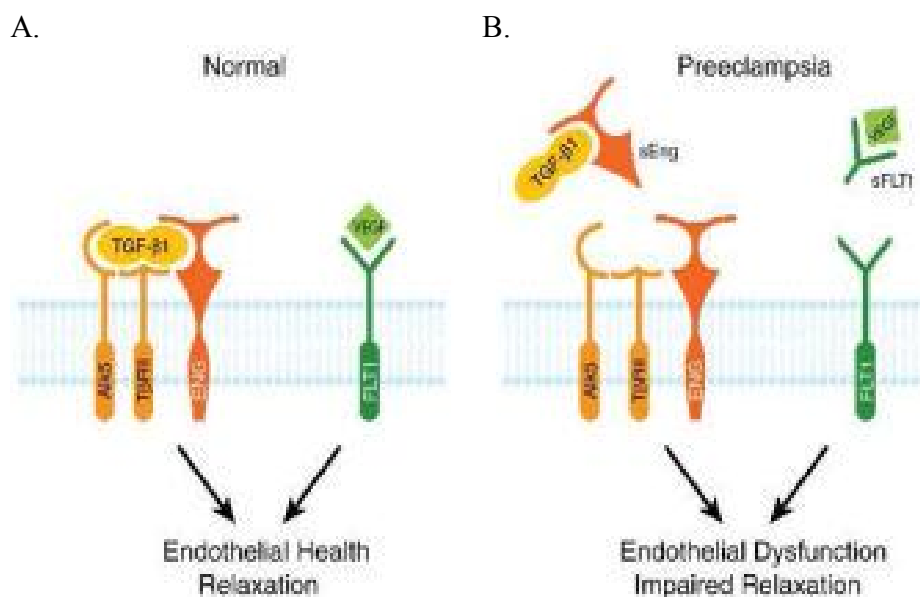
## 2. Endogline soluble (sEng)

L'endogline (eng ou CD105) est un corécepteur des Transforming growth factor B1 et B3 (TGF-B1 et TGF-B2) qui est exprimée à la surface des cellules endothéliales vasculaires et des syncytiotrophoblastes.(69, 70) Les molécules TGF-B sont de puissants facteurs angiogéniques.

Comme pour le sVEGFr ou le sFlt1, le placenta produit une forme soluble de l'endogline (sEng) qui est libérée dans la circulation maternelle. In vitro, Venkatesha et al ont montré

que l'endogline soluble (sEng ou sCD105) inhibe la formation des tubes capillaires et leur vasodilatation normalement induite par TGF-B1 et TGF-B3.(71) Dans cette même étude lorsque les rats recevaient de l'endogline soluble, on observait une suppression du signal TGF-B engendrant une réduction de la NO synthase endothéliale (eNOS) et une diminution de la vasodilatation rénale des micro-vaisseaux. Le taux d'endogline est augmenté significativement chez les patientes prééclamptiques surtout chez les prééclampsies sévères compliquées d'un HELLP syndrome.(71) Ce taux augmente 2 à 3 mois avant le début des symptômes cliniques de la prééclampsie.(60) Après libération dans la circulation sanguine maternelle, elle crée une souffrance vasculaire endothéliale engendrant une HTA et une augmentation de la perméabilité capillaire.

Figure 9. Schématisation du sFlt1 et sEng d'après Maynard SE et al. (72)

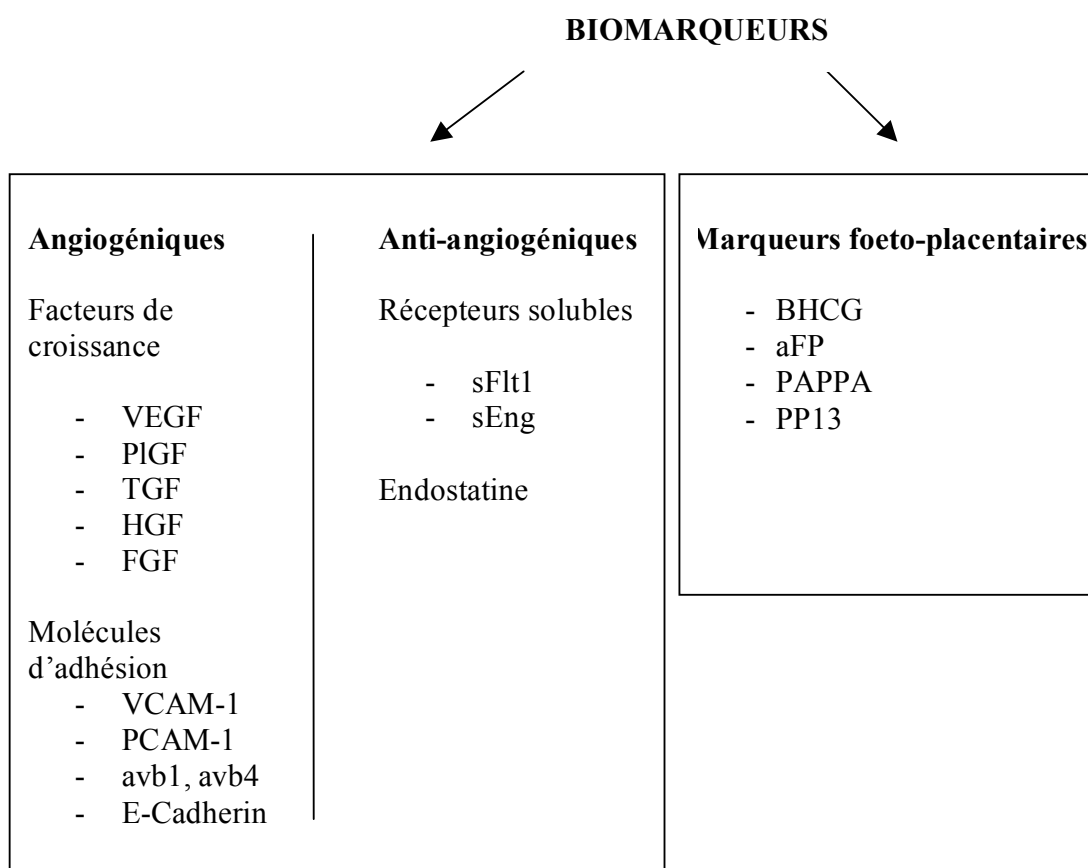


- A. Au cours de la grossesse normale, VEGF et TGF-B se lient à leurs récepteurs respectifs Flt-1 et l'endogline.
- B. Lors d'une prééclampsie, une production placentaire excessive et anormale des récepteurs solubles sFlt1 et sEng inhibe l'action du VEGF et du TGF en les empêchant de se fixer à leurs récepteurs.

### 3. Endostatine

L'endostatine dérive de la partie C-terminale non collagénique (NC1) du collagène XVIII.(73, 74) Cette protéine a éveillé l'intérêt des chercheurs dans la recherche contre le cancer. Par sa fonction spécifique sur la cellule endothéliale, il a été montré que l'endostatine inhibe la croissance tumorale.(73, 75) In vitro l'endostatine inhibe la prolifération et la migration des cellules endothéliales de manière spécifique.(73)Récemment, des biologistes ont mis en évidence le rôle de l'endostatine, comme un puissant anti-angiogénique dans la prééclampsie. Ces études sont encore peu nombreuses et portent sur de petits échantillons. Les récentes études mettent en évidence des taux d'endostatine significativement plus élevés chez les patientes prééclamptiques.(76-79) Selon Mahmoud R .A .K portant sur 84 patientes, dont 20 avaient une PE bénigne et 24 une PE sévère, le taux sérique de l'endostatine était significativement plus élevé chez les prééclampsies sévères que chez les prééclampsies bénignes.(79) L'étude de Wathen K.A est une étude cas-témoin (49 prééclamptiques dont 20 définies comme sévères, et 59 témoins) portant sur des dosages d'endostatine réalisés au 1<sup>er</sup> et 2eme trimestres.(78) Entre 12 et 15 semaines, la concentration sérique de l'endostatine tend à augmenter chez les patientes qui développeront une prééclampsie mais la différence n'est pas statistiquement significative, alors qu'entre 16 et 20 semaines la différence devient statistiquement significative. La concentration la plus élevée était chez les prééclampsies sévères. Dans l'étude la plus récente de Wikstrom AK portant sur 92 patientes incluant 35 cas de prééclampsies, dont 16 précoces (avant 32 semaines) et 19 tardives (supérieur ou égale à 32 semaines), l'endostatine était dosée dans le plasma et était statistiquement plus élevée chez les prééclampsies précoces que tardives. Après ajustement pour le BMI et le tabagisme, la différence restait significative. L'auteur ne retrouvait pas de différence entre les prééclampsies tardives et les groupes contrôles. Aucune étude à l'heure actuelle n'a étudié la combinaison de l'endostatine à d'autres biomarqueurs et évalué sa valeur prédictive.(77)

Tableau 3. Résumé des biomarqueurs de la prééclampsie



## **Chapitre IV. PROBLEMATIQUE : prédiction de la prééclampsie**

De nombreuses études se sont penchées sur la prédiction de la prééclampsie. En effet, des interventions précoces pourraient être utiles pour améliorer la placentation dès le 1<sup>er</sup> trimestre et ainsi mieux prévenir la prééclampsie. (80) De nombreuses approches ont été proposées pour prédire la prééclampsie, et dépister les sujets à haut risque.

La première catégorie est représentée par les marqueurs cliniques, d'où la nécessité d'un interrogatoire rigoureux à l'affût des facteurs de risque (développés dans le chapitre II) en début de grossesse. Notons que plus les facteurs de risques sont nombreux chez une patiente, plus son risque de développer une prééclampsie augmente. (81)

Malheureusement, la seule utilisation des marqueurs cliniques ne suffit pas à prédire de manière efficace la maladie. Dans une revue de la littérature en 2004, Conde-Agudelo concluait qu'il n'y avait pas de test de dépistage clinique utile pour prédire la prééclampsie quel que soit le niveau de risque de la population (bas ou haut risque). (82) Le dépistage basé sur les simples marqueurs cliniques identifierait simplement 30% des cas de prééclampsie précoce et 20% des prééclampsies tardives pour un taux de faux positifs de 5%. (83) On retrouve les mêmes tendances dans l'étude de Poon et al. avec un taux de détection de prééclampsie précoce et tardive en utilisant simplement les facteurs de risque maternels de 37 % et 29% respectivement pour un taux de faux positifs de 5%. (84)

Depuis quelques années, les chercheurs se sont concentrés à trouver des marqueurs biologiques dosés dans le sang maternel et qui sont impliqués dans la physiopathologie de la prééclampsie afin d'en améliorer le dépistage. La littérature portant sur ces biomarqueurs potentiellement prédictifs de la maladie est extrêmement riche, et régulièrement on en découvre des nouveaux. Néanmoins les plus prometteurs actuellement ont été développés dans le chapitre III (VEGF, PlGF, sFlt1, sEng). En plus des marqueurs cliniques et des marqueurs biologiques, une troisième voie de dépistage a été développée : le Doppler des artères utérines réalisé au cours de l'échographie morphologique au 2<sup>ème</sup> trimestre. En effet la perfusion placentaire

inadéquate au cours de la prééclampsie a conduit à l'utilisation du Doppler pour évaluer la vitesse du flux sanguin dans les artères utérines. La persistance d'un notch diastolique après la 24<sup>ème</sup> semaine d'aménorrhée a été associée à une anomalie de l'invasion trophoblastique. Selon l'étude de Chien, une telle anomalie est associée à un risque de prééclampsie multiplié par 6 comparé à une patiente avec un Doppler normal des artères utérines.(85) Une revue systématique en 2008 montre que l'utilisation du Doppler au 1<sup>er</sup> trimestre est moins précise au 1<sup>er</sup> trimestre qu'au 2<sup>nd</sup> trimestre de grossesse pour prédire la prééclampsie. L'étude montre que le paramètre du Doppler le plus prédictif de la prééclampsie est l'index de pulsatilité seul ou combiné avec la présence d'un notch après la 24<sup>ème</sup> semaine.(86)

Actuellement, il n'y a pas de recommandation de l'utilisation du Doppler pour la prédiction de la prééclampsie.(86) Pourtant, plusieurs études ont montré que la combinaison du Doppler aux biomarqueurs angiogéniques et anti-angiogéniques au 2<sup>ème</sup> trimestre avait un haut taux de détection surtout pour la prééclampsie précoce.(87, 88) Récemment, de nombreux modèles prédictifs combinant ces trois marqueurs que nous venons de décrire (cliniques, biologiques et vélocimétriques) voient le jour. Le but étant aujourd'hui de trouver l'algorithme qui permettra de dépister au mieux la prééclampsie c'est-à-dire de trouver un test qui présentera la meilleure valeur prédictive pour un taux de faux positif le plus faible possible.

Dans une revue systématique pour l'organisation mondiale de la santé (OMS) Conde-Agudelo et al. cherchaient à évaluer l'efficacité des tests cliniques, biochimiques et biophysiques dans la prédiction de la prééclampsie.(82) Quatre-vingt sept études ont été retenues, excluant toutes les études cas-témoins et conservant les études de cohortes, soit un total de 211369 patientes. Les tests retrouvés dans ces 87 études étaient très variables et ont été regroupés en 4 catégories par l'auteur :

Tableau 4. Tests de dépistage de la prééclampsie identifiés dans la littérature, d'après Conde-Agudelo et al 2004.(82)

1.	<b>Perfusion placentaire et résistance vasculaire</b> : Pression artérielle au 2 <sup>ème</sup> trimestre, Angiotensine 2, écho-Doppler, pression artérielle sur 24h.
2.	<b>Dysfonction endocrinologique foeto-placentaire</b> : HCG, AFP, Oestriol, Inhibine A, PAPP-A, Activine A, Corticotropine
3.	<b>Dysfonction rénale</b> : Acide urique, Microalbuminurie, Calciurie, Kallikreine urinaire, Microtransferrinurie, N-acetyl-B-glucosaminidase
4.	<b>Dysfonction endothéliale et stress oxydatif</b> : Plaquettes, Fibronectine, Endotheline, Prostacycline, Thromboxane, Cytokine, Homocystéine, Isoprostane, Lipides sériques, Résistance insulinique, Anticorps antiphospholipides, Plasminogene, PlGF, Leptine, Hématocrite, protéines totales, Antithrombine 3, Magnésium, Calcium, Ferritine,
5.	Transferrine, Haptoglobine, peptide atrial natriurétique, B2-microglobuline, marqueurs génétiques.

L'auteur retrouvait une valeur prédictive modérée de 3 tests lorsqu'ils étaient utilisés dans une population à bas risque. Il s'agissait des anticorps anticardiolipines, de la présence de notchs bilatéraux, et de la kallikreine urinaire. Dans la population à haut risque, l'utilisation du Doppler avait une valeur prédictive faible. En ce qui concernait les autres tests, ils n'étaient pas suffisamment nombreux pour que leur efficacité clinique soit évaluée.

Au total l'auteur concluait qu'il n'y avait pas encore à l'heure actuelle de test de dépistage suffisamment prédictif pour une utilisation systématique quel que soit la population d'étude (haut ou bas risque).

Une étude plus récente portant sur une cohorte de 7797 grossesses menée par Poon et al. en 2009 (89) obtenait des résultats encourageants en combinant des marqueurs cliniques

comme la pression artérielle à des marqueurs biophysiques comme le Doppler des artères utérines (index de pulsatilité) et aux marqueurs biochimiques PlGF et PAPP-A dès le 1<sup>er</sup> trimestre. Une méthode de régression logistique permettait d'obtenir des algorithmes de prédiction spécifiques pour la prééclampsie précoce, tardive ou l'hypertension gestationnelle. En ce qui concernait la prééclampsie précoce Poon et al. obtenait un taux de dépistage de 93% pour 5% de faux positifs ce qui est nettement supérieur à l'approche traditionnelle de dépistage basé sur les données cliniques maternelles seules qui ne dépiste que 30% des prééclampsies précoces pour 5% de faux positifs.(83) Cependant, dans une autre étude, l'ajout du Doppler dans l'algorithme combinant les marqueurs cliniques aux marqueurs biologiques tels que PlGF, PAPP-A et inhibine-A n'améliorait pas la prédiction.(90)

A l'heure actuelle il n'existe pas de modèle prédictif suffisamment efficace pour qu'il soit utilisé par les cliniciens dans une routine de dépistage. La prééclampsie reste cependant une maladie fréquente qui lorsqu'elle se complique met en jeu le pronostic vital fœto-maternel. C'est donc dans ce contexte que notre travail s'inscrit en dosant un biomarqueur encore très peu étudié : l'endostatine, puis en le combinant à des marqueurs cliniques bien connus de la prééclampsie pour ainsi évaluer son potentiel prédictif de la maladie.



## **CHAPITRE V : ARTICLE**

### **5.1 Hypothèse de travail**

En s'appuyant sur les connaissances exposées précédemment nous émettons l'hypothèse que la sécrétion d'endostatine chez les patientes qui développent une prééclampsie est perturbée. L'endostatine étant un marqueur anti-angiogénique, nous pensons que son taux est plus élevé chez les grossesses compliquées d'une prééclampsie comparées aux grossesses normales.

Nous émettons par ailleurs l'hypothèse que l'endostatine a une valeur pronostique de prééclampsie d'autant plus que celle-ci serait précoce et/ou sévère. L'objectif général de ce projet était d'étudier les concentrations sériques de l'endostatine au 1<sup>er</sup> et 2<sup>eme</sup> trimestre de grossesse sur des échantillons sanguins congelés prélevés initialement dans deux cohortes prospectives réalisées au Canada.

## **Maternal levels of endostatin and the risk of subsequent preeclampsia**

S Thissier-Levy, I Boucoiran, Y Wu, SQ Wei, ZC Luo, AM Nuyt, P Julien,  
W Fraser, F Audibert

*Department of Obstetrics and Gynecology, Université de Montréal, CHU Ste Justine  
Research Center, Montreal, QC, Canada*

### **Correspondence to:**

Docteur François Audibert

CHU Ste Justine

3175 Cote Ste Catherine

Montreal, Qc H3T 1C5

### **Word count**

Abstract = 235 ; Main text = 2140

**Tables/Figures: 3/1**

**Keywords :** Preeclampsia, Endostatin, angiogenic biomarker

**ABSTRACT**

**OBJECTIVE:** To evaluate a new anti-angiogenic factor, endostatin, in relation to the risk of preeclampsia (PE).

**STUDY DESIGN:** We performed a case control study nested in two separate prospective cohorts. Serum samples were collected at 11-17 weeks and 18-26 weeks of gestation. Maternal endostatin levels were measured by ELISA. Results were expressed as multiples of the median (MoM) adjusted for maternal age, gestational age, ethnicity, and cohort of origin. Logistic regression was used to calculate adjusted odds ratios (aORs) of PE.

**RESULTS:** A total of 77 PE and 150 controls of singleton pregnancies were studied, including 21 early-onset PE (diagnosis before 34 weeks) and 41 severe PE. Cases had a higher pre-pregnancy BMI and were more likely of African ethnicity than controls. Endostatin levels were significantly higher in women with PE compared to controls at both the first and second trimester (median 94.2 vs. 90.7 ng/ml  $p=0.004$  and 105.8 vs. 99.3 ng/ml  $p=0.002$  respectively). Endostatin levels were even higher in women with early-onset PE. At a cut-off level of 75th percentile of endostatin MoMs, the adjusted ORs for PE were 1.33, 95CI [0.68-2.58] at 11-17 weeks and 1.77 [0.94-3.34] at 18-26 weeks. The aORs for early-onset PE were 3.51 [1.18-10.43] at 11-17 weeks and 2.17 [0.67-7.06] at 18-26 weeks, respectively.

**CONCLUSION:** Higher endostatin levels as early as in the first trimester may indicate an increased risk of subsequent PE, especially early onset PE.

## INTRODUCTION

Preeclampsia (PE) is a major cause of maternal and perinatal mortality and morbidity.[1] This disease affects about 3 to 7% of pregnant women.[2] Although its etiology is heterogeneous and remains unclear, it has been hypothesized that PE is a disease of the maternal endothelium and may be originated from the placenta. Placental factors enter the maternal circulation and cause endothelial dysfunction resulting in hypertension and proteinuria.[1-4] Although underlying mechanisms are developed as early as during the first trimester, clinical features do not appear until the 20th week of gestation or even in the third trimester. The ability to predict patients at risk for the disease would be of great value and would enable a closer monitoring of high risk women, and possibly the use of preventive strategies.

Placentation is under the influence of angiogenic and antiangiogenic factors and their imbalance generates abnormal placental vascularisation.[5] In patients who develop PE, trophoblasts cells have lost their ability to colonize the maternal spiral arteries.[6] This dysfunction could be related to an imbalance between angiogenic and antiangiogenic factors, including endostatin, an inhibitor of tumor growth which is a potent antiangiogenic factor.[7,8] Recent studies have highlighted the role of endostatin in PE.[9-12]

Endostatin is a 20 kDa molecule derived from the noncollagenous domain at the Cterminal of collagen type XVIII.[7-13] In vitro, endostatin specifically inhibits endothelial cell proliferation and migration.[7] Dhanabal et al. have demonstrated, in vitro, that endostatin causes apoptosis specifically of endothelial cells.[8] In vivo, Wen et al. showed that trophoblasts cells attenuated their own invasion by producing proteases that locally release endostatin from the decidua.[14]

The aim of this study was to analyze endostatin levels in the first and second trimester of pregnancy in relation to the risk of subsequent PE.

## STUDY DESIGN

This was a case-control study nested in two separate prospective cohorts: (1) Maternal Infant Research on Oxidative Stress (MIROS) and (2) the Preeclampsia Assessment of Risk by Integrated Screening (PARIS). The MIROS study was based on a randomized placebo-controlled trial of antioxidant supplementation (vitamins C and E).[15] The trial was conducted in Canada (17 centers) and Mexico (10 centers) from January 2004 to March 2006. The design and methods of the trial were described elsewhere.[15] The MIROS study included only patients from centers in Canada, who consented to participate to a biobank and contributed data to this study. The PARIS study was conducted from November 2006 to June 2008 and was specifically designed to study early markers of PE in the first trimester combining maternal serum markers and uterine artery Doppler.[16] Maternal blood samples were collected during two visits. The blood samples obtained from the MIROS study were collected between 12 and 18 weeks gestation (visit 1) then between 24 and 26 weeks gestation (visit 2). In the PARIS study serums were collected between 11 and 13 weeks (visit 1) then between 18 and 22 weeks (visit 2).

The definitions of PE and gestational hypertension were those defined by the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy.[17] Gestational hypertension was defined as blood pressure higher or equal to 140/90 mmHg on 2 readings at least 4 hours apart after 20 weeks of gestation. PE was defined as gestational hypertension with proteinuria higher or equal to 0.3g in 24-hours urine collection. Early onset preeclampsia was defined as preeclampsia diagnosed before 34 weeks. Severe PE was defined as the occurrence of one or more of the following factors: blood pressure higher or equal to 160/110 mmHg, uric proteinuria concentrations  $\geq 5$ g/day, or the presence of an adverse condition including maternal sign of end-organ dysfunction, HELLP syndrome, or fetal compromise, as described elsewhere.[17] All cases of PE were reviewed by 2 independent investigators. In both studies, gestational age was calculated from the date of last menstrual and confirmed by early ultrasound. Controls

were patients without PE, gestational hypertension, intrauterine growth retardation, or placental abruption. In the MIROS study cases and controls were matched by their allocation strata (low-risk vs. high-risk). Women were considered as being “high risk” if they had pre-pregnancy chronic hypertension, pre-pregnancy diabetes, or a history of PE.[15] In the PARIS study cases and controls were matched by gestational age at delivery.

In both studies, maternal non-fasting blood samples were collected, immediately centrifuged, and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until used for the biochemical analyses. Endostatin was measured using an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) (Human endostatin kit: Quantikine, R&D Systems, Minneapolis). Even though endostatin was assayed independently in the two MIROS and PARIS studies, the same biochemical assay was used by the same operator. The laboratory professionals who performed the biochemical assays were blinded to the clinical status of the subjects.

## STATISTICAL ANALYSIS

- The distribution of endostatin was normalized after log-transformation of multiple of median (MoM) values (confirmed by Kolmogorov test).
- We used multiple linear regressions in the unaffected group to obtain expected endostatin levels depending on gestational age, maternal age, ethnicity and cohort of origin. Endostatin levels were then expressed in multiples of the median (MoM) for each subject.
- Maternal characteristics between cases and controls were compared by chi-square test and Fisher’s exact test for categorical variables and by the student  $t$  test for continuous variables.
- Endostatin levels, expressed in MoM, were compared after data log transformation by the student T test between cases and controls. We categorized endostatin into percentiles, with a cut-off of 75th percentile.
- We conducted univariate and multivariate logistic regression analyses by adjusting for potential confounding factors to determine the odds of preeclampsia in subjects who had endostatin levels higher than the 75th percentile, as compared

to those who were less than the 75th percentile.

- The performance of screening was determined by ROC curves and area under the ROC curve (AUC).

All analyses were performed using SPSS 17.0 (SPSS Inc, Chicago, IL) and STATA 10.0 (StataCorp, College Station, TX). A *P* value under 0.05 was considered significant.

## RESULTS

Among the 34 cases of PE and 68 controls in the MIROS cohort, 3 controls were excluded for missing outcome data. Another group of sixteen women, including 5 cases and 11 controls, were excluded from further analysis because of multiple gestations. The PARIS cohort included 48 cases and 96 controls. Therefore, the statistical analysis were based on a total of 227 women, including 77 cases of PE, (29 from the MIROS study, 37.7% and 48 from the PARIS study, 62.3%) and 150 controls. Among the 77 preeclamptic cases 21 (27.3%) had early-onset PE and 41 (53.2%) had severe PE.

Baseline characteristics were different between the two cohorts in the unaffected group. All controls from PARIS were nulliparous vs. 57.4% in MIROS ( $p=0.0001$ ). The average age in the control group from MIROS was slightly higher (30.9 vs. 29.4  $p=0.046$ ) and more likely to smoke (18.5% vs. 5.2%  $p=0.009$ ).

The clinical characteristics of women are summarized in table 1. There was no difference between cases of PE and controls for maternal age, smoking, and parity. There was no difference between cases and controls for vitamin C and E supplementation (19.5% vs. 17.3%  $p = 0.924$ ) in the MIROS cohort. Women with PE had a higher BMI and were more likely of African ethnicity. Controls from MIROS were older ( $p=0.003$ ) and more likely to smoke ( $p=0.009$ ).

Endostatin levels were significantly higher in women with PE compared to controls in both the first (MoM: 1.10 vs. 1.01,  $p=0.004$ ) and second trimester (MoM: 1.11 vs. 0.99,  $p=0.002$ ) (Table 2). Endostatin levels were even higher in women with subsequent earlyonset PE at 18-26 weeks of gestation.

Table 3 shows the logistic regression analysis for risk of PE and early-onset PE. At a cut-off level of 75th percentile of endostatin MoMs (corresponding to 1.10 MoM between 11-17 weeks and 1.09 between 18-26 weeks), the adjusted ORs for PE were 1.33, 95CI [0.68-2.58] at 11-17 weeks and 1.77 [0.94-3.34] at 18-26 weeks of gestation. The adjusted ORs for early-onset PE were 3.51 [1.18-10.43] at 11-17 weeks and 2.17 [0.67-7.06] at 18-26 weeks, respectively.

Figure 1 shows the AUC of the clinical characteristics only and the combination with endostatin. The addition of endostatin levels to maternal characteristics alone improved the prediction of PE significantly (AUC 0.594 versus 0.674  $p=0.009$ ).

## COMMENTS

In this case-control study, the endostatin levels in the first trimester were significantly higher in women who developed PE than in controls, especially at the second trimester for early-onset disease. Although we clearly observed an association between a high level of endostatin and preeclampsia, we found that ROC characteristics are poor for endostatin as a predictor of preeclampsia. Current literature about the role of endostatin in PE is scarce. However, a few studies found a link between endostatin and the risk of PE. Hirtenlehner et al.[9] found that patients with PE had higher crude endostatin levels than unaffected patients. The authors showed no significant difference between healthy pregnant and nonpregnant women. Wikstrom et al.[10] confirmed this result in women with early-onset PE between 24-32 weeks, who had significantly higher endostatin levels compared with controls matched for gestational age. In contrast, at 36-42 weeks, endostatin levels were similar in PE and controls. In our study, there was an association between endostatin levels at 11-17 and 18-26 weeks of gestation and subsequent PE. A case-control study performed by Wathen et al [11], showed the same result: at 12-15 weeks, endostatin concentration tended to be higher in preeclamptic subjects but the difference was not significant probably resulting from a small sample size. In our study, the endostatin levels were unaffected by gestational age at blood sampling. Other authors



[9, 12] did not find any correlation between endostatin level and gestational age, in samples ranging from 24 to 42 weeks.

Endostatin, derived from collagen type XVIII, inhibits endothelial migration. Collagen XVIII is located in villous basement and in myofibroblastic cells in the human placenta.[13] This implies that endostatin originates from the placenta. However Wikstrom [10] and Hirtenlehner [9] did not find any difference between healthy pregnant and nonpregnant women. One could hypothesize that endostatin could also be derived from other sources such as platelets or blood vessels.[9, 14, 18] It would be interesting to perform specific studies on platelets from preeclamptic and healthy women in future research.

In another study [19], Malamitsi-Puchner et al. compared endostatin levels in intrauterine growth restriction (IUGR) and in appropriate for gestational age (AGA) neonates. They found higher levels in cord blood samples of AGA compared to IUGR neonates. In most cases, IUGR neonates were born to women with gestational hypertension or PE. However maternal endostatin levels did not differ between IUGR cases and controls. This result is in contrast with our study and other recent studies. However, their samples were obtained at the time of delivery. Also, the number of women with gestational hypertension or PE was limited (n=16).[19]

Our study has several strengths. The case-control design nested in two cohorts permitted to preserve the advantage of a prospective cohort. Blood samples were taken before the clinical onset of disease. To our knowledge, our study is the largest to date to evaluate the relation between endostatin and PE. We confirmed that higher endostatin levels as early as in the first trimester were associated with the risk of subsequent PE. The most frequently studied antiangiogenic factors in PE were sFlt1 (also known as soluble VEGF receptor 1) and s endoglin, who are both increased in women with subsequent PE.[20-23] sFlt1 neutralizes VEGF and placenta growth factor (PlGF), two angiogenic molecules, whereas s-endoglin inhibits TGF-1 and acts in concert with s-Flt1 to induce endothelial dysfunction.[22] We believe that endostatin, a new antiangiogenic factor must be taken into account in studies on the prediction of preeclampsia. Moreover, the PlGF/Endostatin ratio should be studied, as the PlGF/sEng ratio has been shown to predict early-onset PE

accurately.[24] Endostatin combined with other angiogenic and antiangiogenic markers may improve the prediction of PE.

Our study had some limitations. First, we found a significant difference in endostatin levels between the two cohorts of origin. Different reasons could explain this difference. First, the samples of the MIROS study were older than the ones of the PARIS study. A longer sample storage may decrease the levels of any analyte. However, in the MIROS cohort the levels remained significantly higher in cases than controls, despite a longer shelf life. There is some disparity in maternal characteristics between the two study cohorts, due to differences in recruitment criteria. For this reason, all analyses were performed with adjustment for the cohort of origin.

In summary, we have shown increased endostatin levels at as early as the first trimester in women with subsequent PE. This finding supports the findings of other authors [9-12] and suggests that endostatin, among other angiogenic / antiangiogenic factors, may play a pathological role in PE. Larger studies are needed to analyze endostatin combined with other angiogenic / antiangiogenic factors in predicting the development of preeclampsia.

**Table 1. Characteristics by clinical outcomes**

	<b>All preeclampsia n=77</b>	<b>Early preeclampsia n=21</b>	<b>Severe preeclampsia n= 41</b>	<b>Controls n=150</b>
Maternal age, median (IQR)	30 (27-33.5)	32 (27.5-35.5)	29 (26.5-34.5)	30 (27-33)
Smoking, n (%)	8 (10.4)	4 (19.0)	8 (19.5)	15 (10.0)
Nulliparous, n (%)	60 (77.9)	15 (71.4)	33 (80.5)	127 (84.7)
Pre-pregnancy BMI, median (IQR)	26.75 (22.5-30.5)**	28.9 (22.4-32.6)*	25.2 (22.5-29.9)**	23.1 (20.8-25.7)
Ethnicity, n (%)				
White	61 (79.2)	14 (66.7)	32 (78.0)	124 (82.7)
African	10 (13.0)**	5 (23.8)	6 (14.6)**	4 (2.7)
Hispanic	2 (2.6)	0	1 (2.4)	6 (4.0)
Asian	1 (1.3)	1 (4.8)	1 (2.4)	3 (2.0)
Other/Mixed	3 (3.9)	1 (4.8)	1 (2.4)	13 (8.7)
Gestational age at delivery, wk, median (IQR)	37.3(35.8-39.0)**	34 (31.1-36.1)**	36 (33.7-38.0)**	39.7 (38-40.4)
Birthweight, g, median (IQR)	2905 (2185-3356.5)**	1825 (1410-2512.5)**	2394 (1733-3277)**	3407.0 (3085.8-3675.3)
Chronic hypertension, n (%)	16 (20.8)**	8 (38.1)**	12 (29.3)**	6 (4.0)

*X<sup>2</sup> test for categorical variables and Mann-Whitney test for continuous variables were used to compare adverse outcome groups with control group. All comparisons are versus control group.*

BMI: Body mass index (kg/m<sup>2</sup>)

\* p < 0.05

\*\* p < 0.001

Crude value: median and interquartile range for levels of endostatin

\*Student test on log-transformed MoM data.

**Table 2. Endostatin levels in preeclamptic and unaffected pregnancies**

<b>Model</b>	<b>p</b>	<b>aOR</b>	<b>95%CI</b>
<b>All preeclampsia vs controls</b>			
Visit 1 11-17 wks	0.401	1.33	0.685-2.58
Visit 2 18-26 wks	0.078	1.77	0.939-3.34
<b>Early onset preeclampsia vs controls</b>			
Visit 1 11-17 wks	<b>0.024</b>	3.51	1.18-10.43
Visit 2 18-26 wks	0.198	2.17	0.668-7.06

Crude values are presented as median (inter-quartile range).

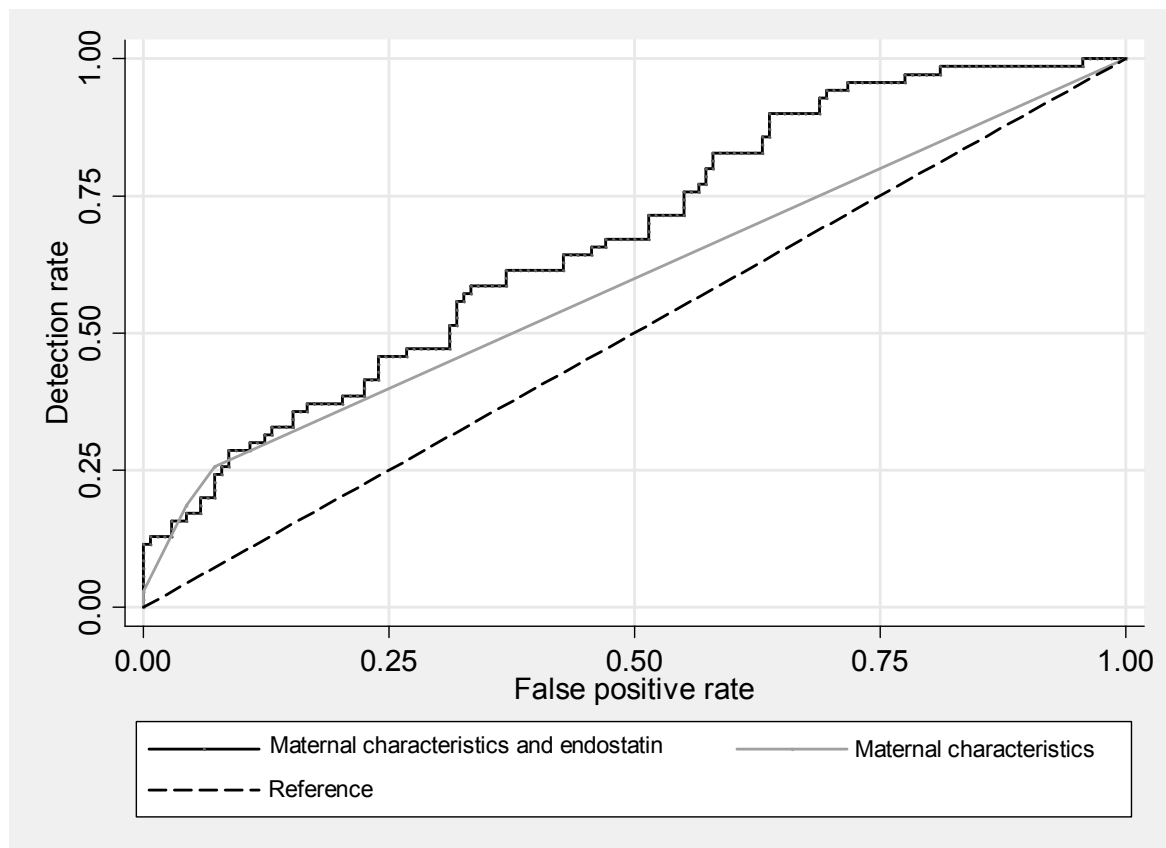
MoM = multiples of the median, (adjusted for cohort of origin, gestational age, ethnicity, and maternal age)

**Table 3. Multivariate logistic regression: OR of preeclampsia in association with endostatin MoM >75<sup>th</sup> percentile**

	Affected		Unaffected		p*
	Crude value (ng/ml)	MoM	Crude value (ng/ml)	MoM	
All PE (n = 77)					
Endostatin 11-17 wks	94.2 (77.5-112.1)	1.10	90.7 (56.6-193.6)	1.01	0.004
Endostatin 18-26 wks	105.8 (87.5-119.2)	1.11	99.3 (57.1-164.9)	0.99	0.002
Early onset PE (n = 21)					
Endostatin 11-17 wks	91.3 (81.3-118.2)	1.19	90.7 (56.6-193.6)	1.01	0.134
Endostatin 18-26 wks	112.9 (92.5-134.3)	1.22	99.3 (57.1-164.9)	0.99	0.035
Severe PE (n = 41)					
Endostatin 11-17 wks	84.55 (73.4-110.7)	1.09	90.7 (75.4-104.2)	1.01	0.068
Endostatin 18-26 wks	99.2 (86.1-114.1)	1.14	99.3 (76.8-113.9)	0.99	0.024

aOR: Odd ratio adjusted for ethnicity and HTA chronic, CI : Confidence interval

**Figure1. Receiver operating characteristic (ROC) curve showing the ability of maternal endostatin concentration with maternal characteristics to predict preeclampsia at 11-17 weeks of gestation compared to maternal characteristics alone.**



With maternal characteristics only, the area under the curve (AUC) was: 0.59

With the addition of endostatin levels, the area under the curve (AUC) was: 0.67

Statistical difference was significant,  $p=0.009$

## REFERENCES OF ARTICLE

1. Walker, J.J., *Pre-eclampsia*. Lancet, 2000. 356(9237): p. 1260-5.
2. Sibai, B., G. Dekker, and M. Kupferminc, *Pre-eclampsia*. Lancet, 2005. 365(9461): p. 785-99.
3. Cockell, A.P., et al., *Human placental syncytiotrophoblast microvillous membranes impair maternal vascular endothelial function*. Br J Obstet Gynaecol, 1997. 104(2): p. 235-40.
4. Redman, C.W., *Latest Advances in Understanding Preeclampsia*. Science, 2005. 308(5728): p. 1592-1594.
5. Agarwal, I. and S.A. Karumanchi, *Preeclampsia and the Anti-Angiogenic State*. Pregnancy Hypertens, 2011. 1(1): p. 17-21.
6. Pijnenborg, R., et al., *Placental bed spiral arteries in the hypertensive disorders of pregnancy*. Br J Obstet Gynaecol, 1991. 98(7): p. 648-55.
7. O'Reilly, M.S., et al., *Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth*. Cell, 1997. 88(2): p. 277-85.
8. Dhanabal, M., *Endostatin induces endothelial cell apoptosis*. 1999. 274(17): p. 11721-11726.
9. Hirtenlehner, K., et al., *Elevated serum concentrations of the angiogenesis inhibitor endostatin in preeclamptic women*. J Soc Gynecol Investig, 2003. 10(7): p. 412-7.
10. Wikstrom, A.K., et al., *Increased circulating levels of the antiangiogenic factor endostatin in early-onset but not late-onset preeclampsia*. Reprod Sci, 2009. 16(10): p. 995-1000.
11. Wathen, K.A., et al., *Maternal serum endostatin at gestational weeks 16-20 is elevated in subsequent pre-eclampsia but not in intrauterine growth retardation*. Acta Obstet Gynecol Scand, 2009. 88(5): p. 593-8.
12. Mahmoud, R.A. and M. Abdel-Raouf, *Serum endostatin and vascular endothelial growth factor levels in patients with pre-eclampsia*. East Mediterr Health J, 2006. 12(1-2): p. 178-87.
13. Saarela, J., et al., *The short and long forms of type XVIII collagen show clear*

- tissue specificities in their expression and location in basement membrane zones in humans.* Am J Pathol, 1998. 153(2): p. 611-26.
14. Wen, W., et al., *The generation of endostatin is mediated by elastase.* Cancer Res, 1999. 59(24): p. 6052-6.
  15. Xu, H., et al., *An international trial of antioxidants in the prevention of preeclampsia (INTAPP).* Am J Obstet Gynecol, 2010. 202(3): p. 239 e1-239 e10.
  16. Audibert, F., et al., *Screening for preeclampsia using first-trimester serum markers and uterine artery Doppler in nulliparous women.* Am J Obstet Gynecol, 2010. 203(4): p. 383 e1-8.
  17. Brown, M.A., et al., *The classification and diagnosis of the hypertensive disorders of pregnancy: statement from the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP).* Hypertens Pregnancy, 2001. 20(1): p. IXXIV.
  18. Ma, L., et al., *Platelets modulate gastric ulcer healing: role of endostatin and vascular endothelial growth factor release.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(11): p. 6470-5.
  19. Malamitsi-Puchner, A., et al., *The role of the anti-angiogenic factor endostatin in intrauterine growth restriction.* J Soc Gynecol Investig, 2005. 12(3): p. 195-7.
  20. Levine, R.J., et al., *Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia.* N Engl J Med, 2004. 350(7): p. 672-83.
  21. Venkatesha, S., et al., *Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia.* Nat Med, 2006. 12(6): p. 642-9.
  22. Levine, R.J., et al., *Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia.* N Engl J Med, 2006. 355(10): p. 992-1005.
  23. Maynard, S.E., et al., *Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia.* J Clin Invest, 2003. 111(5): p. 649-58.
  24. Kusanovic, J.P., et al., *A prospective cohort study of the value of maternal plasma concentrations of angiogenic and anti-angiogenic factors in early pregnancy and midtrimester in the identification of patients destined to develop preeclampsia.* J Matern Fetal Neonatal Med, 2009. 22(11): p. 1021-38.

## CHAPITRE 6: CONCLUSION ET PERSPECTIVES FUTURES

Notre recherche a pu mettre en évidence une association entre l'endostatine, marqueur anti-angiogénique encore peu étudié, et la survenue d'une prééclampsie. Les patientes ayant un taux élevé en endostatine dès le 1<sup>er</sup> trimestre ont un risque 3,5 fois plus élevé de développer une prééclampsie précoce au 3<sup>ème</sup> trimestre. Ce résultat est en accord avec les études récentes. En ce qui concerne la prédiction de la maladie, l'endostatine améliorait de manière statistiquement significative la valeur prédictive par rapport aux marqueurs cliniques seuls. Cependant cette prédiction est encore trop faible pour qu'un dosage de l'endostatine au 1<sup>er</sup> trimestre soit demandé en routine. Notre étude traite d'un sujet d'actualité dans le monde obstétrical. Son intérêt est à la fois médical et financier. L'objectif principal est de trouver un test de dépistage efficace de la prééclampsie afin de mieux prévenir la maladie et d'en diminuer la morbidité et mortalité materno-fœtale. Malheureusement dans notre étude nous n'avons pu analyser qu'un seul biomarqueur, l'endostatine, et d'autres travaux restent à réaliser pour analyser l'endostatine couplé à d'autres biomarqueurs. Le test idéal serait un test précoce dès le 1<sup>er</sup> trimestre avant l'installation des mécanismes physiopathologiques, peu coûteux, facile et reproductible. Les études actuelles portent principalement sur les tests de dépistage de la prééclampsie mais lorsque nous aurons un test de dépistage efficace, que pourrons-nous proposer aux patientes? Hormis une surveillance étroite obstétricale et médicale maternelle et fœtale, quels sont les moyens thérapeutiques que nous pourrons offrir à ces patientes dépistées à haut risque de développer une prééclampsie?

Certains médecins proposent un traitement préventif par aspirine à faible dose plus ou moins couplés à des injections d'anticoagulant de bas poids moléculaire. Mais actuellement aucune étude n'a fait l'objet de recommandation ni en Amérique du Nord ni en Europe.

La méta-analyse de Trivedi et al. (91) cherchait à analyser l'effet de l'aspirine à faible dose dans la prévention de la prééclampsie. Dix-neuf études randomisées ont été identifiées à l'aide de PUBMED et des registres de la Cochrane. Dans le groupe traité par aspirine, le taux d'incidence de prééclampsie était de 6.9% contre 7.8% dans le groupe



placebo. L'auteur a divisé la population d'étude en deux groupes : haut risque et bas risque. Dans la population à haut risque chez les patientes traitées par aspirine à faible dose, on observait une réduction de 21% de l'incidence de la prééclampsie (RR 0.86, IC95% 0.65-0.97) comparé au groupe placebo. Mais dans la population à faible risque le traitement par aspirine ne montrait pas de diminution significative (RR 0.86, IC95% 0.64-1.17).

Pourtant dans la méta-analyse de Bujold et al. portant sur les patientes à moyen et haut risque de prééclampsie, on observait une réduction significative de prééclampsie dans le groupe traité par aspirine à faible dose comparé au groupe placebo lorsque l'aspirine avait été instauré avant la 16<sup>ème</sup> semaine (RR 0.47, IC95% 0.34-0.65). Mais ces effets n'étaient plus retrouvés lorsque l'aspirine était administrée après 16 semaines (RR 0.81 IC95% 0.63-1.03).(80) Cette méta-analyse a vivement relancé l'intérêt pour une prescription précoce de l'aspirine chez des femmes à haut risque, d'où l'intérêt croissant pour des marqueurs efficaces dès le 1<sup>er</sup> trimestre.

En ce qui concerne les traitements anticoagulants, une étude pilote randomisée multicentrique a permis de mettre en évidence leur efficacité sur la diminution des complications d'origine placentaire chez les patientes à haut risque sans thrombophilie. Les auteurs comparaient un groupe traité par dalteparin à un groupe non traité. Les injections étaient quotidiennes et commençaient avant 16 semaines de grossesse pour être arrêtées à 36 semaines. Les auteurs obtenaient des résultats encourageants montrant une diminution significative des complications placentaires sévères tels que la prééclampsie sévère, les restrictions de croissance sévères (<5<sup>ème</sup> percentile) et les décollements placentaires sévères (OR 0.15, IC95% 0.03-0.7). (92)

La prééclampsie reste une maladie mal comprise, dont les complications rares peuvent être gravissimes à la fois pour la mère et l'enfant mais aussi à long terme chez la mère sur le plan cardiovasculaire. Il est donc indispensable de poursuivre les recherches et cela dans différentes disciplines : sur le plan moléculaire et biochimique pour mieux comprendre la physiopathologie, sur le plan clinique pour améliorer les tests de dépistage et évaluer des interventions de prévention primaire, et sur le plan génétique pour

découvrir peut-être des profils génétiques à haut risque. Nous devons également encourager les essais cliniques randomisés pour qu'un jour les patientes dépistées à haut risque puissent bénéficier d'un traitement efficace.

Notre travail a permis d'améliorer les connaissances sur l'endostatine, un marqueur antiangiogénique encore peu étudié dans la physiopathologie de la prééclampsie. Les concentrations élevées de ce biomarqueur dès le 1<sup>er</sup> trimestre chez les patientes qui vont développer une prééclampsie plusieurs semaines plus tard doivent le faire considérer comme un marqueur précoce de la maladie et inciter d'autres études à évaluer l'endostatine en le combinant à d'autres marqueurs.

## BIBLIOGRAPHIE DU MEMOIRE

1. Redman CW. Latest Advances in Understanding Preeclampsia. *Science*. 2005;308(5728):1592-4.
2. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet*. 2005;365(9461):785-99.
3. Magee LA, Helewa M, Moutquin JM, von Dadelszen P. Diagnosis, evaluation, and management of the hypertensive disorders of pregnancy. *Journal of obstetrics and gynaecology Canada : JOGC = Journal d'obstetrique et gynecologie du Canada : JOGC*. 2008;30(3 Suppl):S1-48.
4. Brown MA, Lindheimer MD, de Swiet M, Van Assche A, Moutquin JM. The classification and diagnosis of the hypertensive disorders of pregnancy: statement from the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP). *Hypertension in pregnancy : official journal of the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy*. 2001;20(1):IX-XIV.
5. ACOG practice bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. Number 33, January 2002. *Obstetrics and gynecology*. 2002;99(1):159-67.
6. Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2000;183(1):S1-S22.
7. Prise en charge multidisciplinaire de la prééclampsie. Recommandations formalisées d'experts communes. Société française d'anesthésie et de réanimation. Collège national des gynécologues et obstétriciens français. Société française de médecine périnatale. Société française de néonatalogie. *Ann Fr Anesth Reanim*. 2009;28(3):275-81.
8. Audibert F, Salomon LJ, Castaigne-Meary V, Alves K, Frydman R. Selective termination of a twin pregnancy as a treatment of severe pre-eclampsia. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology*. 2003;110(1):68-9.
9. Audibert F, Saloman LJ, Frydman R. Selective fetocide reverses preeclampsia in discordant twins. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2005;193(3 Pt 1):894; author reply -5.
10. Piering WF, Garancis JG, Becker CG, Beres JA, Lemann J, Jr. Preeclampsia related to a functioning extrauterine placenta: report of a case and 25-year follow-up. *Am J Kidney Dis*. 1993;21(3):310-3.
11. Xiong X, Demianczuk NN, Saunders LD, Wang FL, Fraser WD. Impact of preeclampsia and gestational hypertension on birth weight by gestational age. *Am J Epidemiol*. 2002;155(3):203-9.
12. Tanaka M, Jaamaa G, Kaiser M, Hills E, Soim A, Zhu M, et al. Racial disparity in hypertensive disorders of pregnancy in New York State: a 10-year longitudinal population-based study. *Am J Public Health*. 2007;97(1):163-70.
13. Conde-Agudelo A, Belizan JM. Risk factors for pre-eclampsia in a large cohort of Latin American and Caribbean women. *BJOG*. 2000;107(1):75-83.
14. Wallis AB, Saftlas AF, Hsia J, Atrash HK. Secular trends in the rates of preeclampsia, eclampsia, and gestational hypertension, United States, 1987-2004. *Am J Hypertens*. 2008;21(5):521-6.

15. Beaufile M, Larget D, Chretien J, Salat-Baroux J, Richet G. Hypertensions artérielles gravidiques et médecine préventive. Etude des facteurs étiologiques et du pronostic à moyen terme dans 442 cas. *Bull Acad Natl Med.* 1983;167(5):413-9.
16. Sibai BM, Ramadan MK, Usta I, Salama M, Mercer BM, Friedman SA. Maternal morbidity and mortality in 442 pregnancies with hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets (HELLP syndrome). *Am J Obstet Gynecol.* 1993;169(4):1000-6.
17. INSERM. Epidémiologie de la mortalité maternelle en France, de 1996 à 2002 : fréquence, facteurs et causes.  
[http://www.hal.inserm.fr/docs/00/11/56/83/PDF/BEH\\_Mortal\\_matern\\_Article1\\_Epidemio\\_VD.pdf](http://www.hal.inserm.fr/docs/00/11/56/83/PDF/BEH_Mortal_matern_Article1_Epidemio_VD.pdf). 2006.
18. Khan KS, Wojdyla D, Say L, Gulmezoglu AM, Van Look PF. WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review. *Lancet.* 2006;367(9516):1066-74.
19. Cincotta R, Ross A. A review of eclampsia in Melbourne: 1978-1992. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 1996;36(3):264-7.
20. Duckitt K, Harrington D. Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *BMJ.* 2005;330(7491):565.
21. Saftlas AF, Olson DR, Franks AL, Atrash HK, Pokras R. Epidemiology of preeclampsia and eclampsia in the United States, 1979-1986. *Am J Obstet Gynecol.* 1990;163(2):460-5.
22. Luo ZC, An N, Xu HR, Larante A, Audibert F, Fraser WD. The effects and mechanisms of primiparity on the risk of pre-eclampsia: a systematic review. *Paediatric and perinatal epidemiology.* 2007;21 Suppl 1:36-45.
23. Robillard PY, Dekker GA, Hulsey TC. Revisiting the epidemiological standard of preeclampsia: primigravidity or primipaternity? *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology.* 1999;84(1):37-41.
24. Merviel P, Touzart L, Deslandes V, Delmas M, Coicaud M, Gondry J. Facteurs de risque de la prééclampsie en cas de grossesse unique. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris).* 2008;37(5):477-82.
25. Skjaerven R, Wilcox AJ, Lie RT. The interval between pregnancies and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med.* 2002;346(1):33-8.
26. Lie RT, Rasmussen S, Brunborg H, Gjessing HK, Lie-Nielsen E, Irgens LM. Fetal and maternal contributions to risk of pre-eclampsia: population based study. *BMJ.* 1998;316(7141):1343-7.
27. Adeney KL, Williams MA. Migraine headaches and preeclampsia: an epidemiologic review. *Headache.* 2006;46(5):794-803.
28. Sanchez SE, Qiu C, Williams MA, Lam N, Sorensen TK. Headaches and migraines are associated with an increased risk of preeclampsia in Peruvian women. *Am J Hypertens.* 2008;21(3):360-4.
29. Conde-Agudelo A, Althabe F, Belizan JM, Kafury-Goeta AC. Cigarette smoking during pregnancy and risk of preeclampsia: a systematic review. *Am J Obstet Gynecol.* 1999;181(4):1026-35.
30. Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest.* 2003;111(5):649-58.
31. Heeschen C, Jang JJ, Weis M, Pathak A, Kaji S, Hu RS, et al. Nicotine stimulates angiogenesis and promotes tumor growth and atherosclerosis. *Nat Med.* 2001;7(7):833-9.

32. Jeyabalan A, Powers RW, Clifton RG, Van Dorsten P, Hauth JC, Klebanoff MA, et al. Effect of smoking on circulating angiogenic factors in high risk pregnancies. *PLoS One*. 2010;5(10):e13270.
33. Cincotta RB, Brennecke SP. Family history of pre-eclampsia as a predictor for pre-eclampsia in primigravidas. *Int J Gynaecol Obstet*. 1998;60(1):23-7.
34. Ward K, Hata A, Jeunemaitre X, Helin C, Nelson L, Namikawa C, et al. A molecular variant of angiotensinogen associated with preeclampsia. *Nat Genet*. 1993;4(1):59-61.
35. Zafarmand MH, Nijdam ME, Franx A, Grobbee DE, Bots ML. The angiotensinogen gene M235T polymorphism and development of preeclampsia/eclampsia: a meta-analysis and meta-regression of observational studies. *J Hypertens*. 2008;26(9):1726-34.
36. Sibai BM, Gordon T, Thom E, Caritis SN, Klebanoff M, McNellis D, et al. Risk factors for preeclampsia in healthy nulliparous women: a prospective multicenter study. The National Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal-Fetal Medicine Units. *Am J Obstet Gynecol*. 1995;172(2 Pt 1):642-8.
37. Audibert F, Friedman SA, Frangieh AY, Sibai BM. Clinical utility of strict diagnostic criteria for the HELLP (hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets) syndrome. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1996;175(2):460-4.
38. Wilson BJ, Watson MS, Prescott GJ, Sunderland S, Campbell DM, Hannaford P, et al. Hypertensive diseases of pregnancy and risk of hypertension and stroke in later life: results from cohort study. *BMJ*. 2003;326(7394):845.
39. Bellamy L, Casas JP, Hingorani AD, Williams DJ. Pre-eclampsia and risk of cardiovascular disease and cancer in later life: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2007;335(7627):974.
40. Zhou Y, Fisher SJ, Janatpour M, Genbacev O, Dejana E, Wheelock M, et al. Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion? *J Clin Invest*. 1997;99(9):2139-51.
41. Lim KH, Zhou Y, Janatpour M, McMaster M, Bass K, Chun SH, et al. Human cytotrophoblast differentiation/invasion is abnormal in pre-eclampsia. *Am J Pathol*. 1997;151(6):1809-18.
42. Redman CW. Current topic: pre-eclampsia and the placenta. *Placenta*. 1991;12(4):301-8.
43. Khong TY, De Wolf F, Robertson WB, Brosens I. Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small-for-gestational age infants. *Br J Obstet Gynaecol*. 1986;93(10):1049-59.
44. Brosens JJ, Pijnenborg R, Brosens IA. The myometrial junctional zone spiral arteries in normal and abnormal pregnancies: a review of the literature. *Am J Obstet Gynecol*. 2002;187(5):1416-23.
45. Furuya M, Kurasawa K, Nagahama K, Kawachi K, Nozawa A, Takahashi T, et al. Disrupted balance of angiogenic and antiangiogenic signalings in preeclampsia. *J Pregnancy*. 2011;2011:123717.
46. Bayhan G, Kocyigit Y, Atamer A, Atamer Y, Akkus Z. Potential atherogenic roles of lipids, lipoprotein(a) and lipid peroxidation in preeclampsia. *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*. 2005;21(1):1-6.

47. Sargent IL, Borzychowski AM, Redman CW. NK cells and human pregnancy--an inflammatory view. *Trends Immunol.* 2006;27(9):399-404.
48. Audibert F, Benchimol Y, Benattar C, Champagne C, Frydman R. Prediction of preeclampsia or intrauterine growth restriction by second trimester serum screening and uterine Doppler velocimetry. *Fetal diagnosis and therapy.* 2005;20(1):48-53.
49. Davidson EJ, Riley SC, Roberts SA, Shearing CH, Groome NP, Martin CW. Maternal serum activin, inhibin, human chorionic gonadotrophin and alpha-fetoprotein as second trimester predictors of pre-eclampsia. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology.* 2003;110(1):46-52.
50. Wald NJ, Morris JK. Multiple marker second trimester serum screening for pre-eclampsia. *Journal of medical screening.* 2001;8(2):65-8.
51. Ranta JK, Raatikainen K, Romppanen J, Pulkki K, Heinonen S. Decreased PAPP-A is associated with preeclampsia, premature delivery and small for gestational age infants but not with placental abruption. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology.* 2011;157(1):48-52.
52. Smith GC, Stenhouse EJ, Crossley JA, Aitken DA, Cameron AD, Connor JM. Early pregnancy levels of pregnancy-associated plasma protein a and the risk of intrauterine growth restriction, premature birth, preeclampsia, and stillbirth. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2002;87(4):1762-7.
53. Dehghani Firouzabadi R, Tayebi N, Ghasemi N, Tahmasbi Z. The association between second-trimester maternal serum alpha-fetoprotein in 14-22 weeks and adverse pregnancy outcome. *Acta Medica Iranica.* 2010;48(4):234-8.
54. Licata NA, Grill SW. The first-passage problem for diffusion through a cylindrical pore with sticky walls. *Eur Phys J E Soft Matter.* 2009;30(4):439-47.
55. Ahmed A, Li XF, Dunk C, Whittle MJ, Rushton DI, Rollason T. Colocalisation of vascular endothelial growth factor and its Flt-1 receptor in human placenta. *Growth factors.* 1995;12(3):235-43.
56. Caniggia I, Winter J, Lye SJ, Post M. Oxygen and placental development during the first trimester: implications for the pathophysiology of pre-eclampsia. *Placenta.* 2000;21 Suppl A:S25-30.
57. Breier G. Angiogenesis in embryonic development--a review. *Placenta.* 2000;21 Suppl A:S11-5.
58. Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, et al. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med.* 2004;350(7):672-83.
59. Taylor RN, Grimwood J, Taylor RS, McMaster MT, Fisher SJ, North RA. Longitudinal serum concentrations of placental growth factor: evidence for abnormal placental angiogenesis in pathologic pregnancies. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 2003;188(1):177-82.
60. Levine RJ, Lam C, Qian C, Yu KF, Maynard SE, Sachs BP, et al. Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N Engl J Med.* 2006;355(10):992-1005.
61. Adelman DM, Gertsenstein M, Nagy A, Simon MC, Maltepe E. Placental cell fates are regulated in vivo by HIF-mediated hypoxia responses. *Genes Dev.* 2000;14(24):3191-203.

62. Caniggia I, Mostachfi H, Winter J, Gassmann M, Lye SJ, Kuliszewski M, et al. Hypoxia-inducible factor-1 mediates the biological effects of oxygen on human trophoblast differentiation through TGFbeta(3). *J Clin Invest*. 2000;105(5):577-87.
63. Grill S, Rusterholz C, Zanetti-Dallenbach R, Tercanli S, Holzgreve W, Hahn S, et al. Potential markers of preeclampsia--a review. *Reprod Biol Endocrinol*. 2009;7:70.
64. Widmer M, Villar J, Benigni A, Conde-Agudelo A, Karumanchi SA, Lindheimer M. Mapping the theories of preeclampsia and the role of angiogenic factors: a systematic review. *Obstetrics and gynecology*. 2007;109(1):168-80.
65. Macedo ML, Luminoso D, Savvidou MD, McEniery CM, Nicolaides KH. Maternal wave reflections and arterial stiffness in normal pregnancy as assessed by applanation tonometry. *Hypertension*. 2008;51(4):1047-51.
66. Chien PF, Owen P, Khan KS. Validity of ultrasound estimation of fetal weight. *Obstetrics and gynecology*. 2000;95(6 Pt 1):856-60.
67. Ahmad S, Ahmed A. Elevated placental soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 inhibits angiogenesis in preeclampsia. *Circulation research*. 2004;95(9):884-91.
68. Jacobs M, Nassar N, Roberts CL, Hadfield R, Morris JM, Ashton AW. Levels of soluble fms-like tyrosine kinase one in first trimester and outcomes of pregnancy: a systematic review. *Reprod Biol Endocrinol*. 2011;9:77.
69. Savvidou MD, Sotiriadis A, Kaihura C, Nicolaides KH, Sattar N. Circulating levels of adiponectin and leptin at 23-25 weeks of pregnancy in women with impaired placentation and in those with established fetal growth restriction. *Clin Sci (Lond)*. 2008;115(7):219-24.
70. Wang Y, de Waard MC, Sterner-Kock A, Stepan H, Schultheiss HP, Duncker DJ, et al. Cardiomyocyte-restricted over-expression of C-type natriuretic peptide prevents cardiac hypertrophy induced by myocardial infarction in mice. *Eur J Heart Fail*. 2007;9(6-7):548-57.
71. Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai J, Mammoto T, Kim YM, et al. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med*. 2006;12(6):642-9.
72. Maynard SE, Karumanchi SA. Angiogenic factors and preeclampsia. *Semin Nephrol*. 2011;31(1):33-46.
73. O'reilly MS. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*. 1997;88:277-85.
74. Saarela J, Rehn M, Oikarinen A, Autio-Harmainen H, Pihlajaniemi T. The short and long forms of type XVIII collagen show clear tissue specificities in their expression and location in basement membrane zones in humans. *Am J Pathol*. 1998;153(2):611-26.
75. Dhanabal M. Endostatin induces endothelial cell apoptosis. 1999;274(17):11721-6.
76. Hirtenlehner K, Pollheimer J, Lichtenberger C, Wolschek MF, Zeisler H, Husslein P, et al. Elevated serum concentrations of the angiogenesis inhibitor endostatin in preeclamptic women. *J Soc Gynecol Investig*. 2003;10(7):412-7.
77. Wikstrom AK, Larsson A, Akerud H, Olovsson M. Increased circulating levels of the antiangiogenic factor endostatin in early-onset but not late-onset preeclampsia. *Reprod Sci*. 2009;16(10):995-1000.

78. Wathen KA, Ylikorkala O, Andersson S, Alfthan H, Stenman UH, Vuorela P. Maternal serum endostatin at gestational weeks 16-20 is elevated in subsequent pre-eclampsia but not in intrauterine growth retardation. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2009;88(5):593-8.
79. Mahmoud RA, Abdel-Raouf M. Serum endostatin and vascular endothelial growth factor levels in patients with pre-eclampsia. *East Mediterr Health J*. 2006;12(1-2):178-87.
80. Bujold E, Roberge S, Lacasse Y, Bureau M, Audibert F, Marcoux S, et al. Prevention of preeclampsia and intrauterine growth restriction with aspirin started in early pregnancy: a meta-analysis. *Obstetrics and gynecology*. 2010;116(2 Pt 1):402-14.
81. Sibai BM, Gordon T, Thom E, Caritis SN, Klebanoff M, McNellis D, et al. Risk factors for preeclampsia in healthy nulliparous women: A prospective multicenter study. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1995;172(2, Part 1):642-8.
82. Conde-Agudelo A, Villar J, Lindheimer M. World Health Organization systematic review of screening tests for preeclampsia. *Obstet Gynecol*. 2004;104(6):1367-91.
83. Yu CK, Smith GC, Papageorgiou AT, Cacho AM, Nicolaides KH. An integrated model for the prediction of preeclampsia using maternal factors and uterine artery Doppler velocimetry in unselected low-risk women. *Am J Obstet Gynecol*. 2005;193(2):429-36.
84. Poon LC, Kametas NA, Chelemen T, Leal A, Nicolaides KH. Maternal risk factors for hypertensive disorders in pregnancy: a multivariate approach. *Journal of human hypertension*. 2010;24(2):104-10.
85. Chien PF, Arnott N, Gordon A, Owen P, Khan KS. How useful is uterine artery Doppler flow velocimetry in the prediction of pre-eclampsia, intrauterine growth retardation and perinatal death? An overview. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology*. 2000;107(2):196-208.
86. Cnossen JS, Morris RK, ter Riet G, Mol BW, van der Post JA, Coomarasamy A, et al. Use of uterine artery Doppler ultrasonography to predict pre-eclampsia and intrauterine growth restriction: a systematic review and bivariable meta-analysis. *CMAJ*. 2008;178(6):701-11.
87. Stepan H, Unversucht A, Wessel N, Faber R. Predictive value of maternal angiogenic factors in second trimester pregnancies with abnormal uterine perfusion. *Hypertension*. 2007;49(4):818-24.
88. Savvidou MD, Noori M, Anderson JM, Hingorani AD, Nicolaides KH. Maternal endothelial function and serum concentrations of placental growth factor and soluble endoglin in women with abnormal placentation. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2008;32(7):871-6.
89. Poon LC, Kametas NA, Maiz N, Akolekar R, Nicolaides KH. First-trimester prediction of hypertensive disorders in pregnancy. *Hypertension*. 2009;53(5):812-8.
90. Audibert F, Boucoiran I, An N, Aleksandrov N, Delvin E, Bujold E, et al. Screening for preeclampsia using first-trimester serum markers and uterine artery Doppler in nulliparous women. *Am J Obstet Gynecol*. 2010;203(4):383 e1-8.
91. Trivedi NA. A meta-analysis of low-dose aspirin for prevention of preeclampsia. *J Postgrad Med*. 2011;57(2):91-5.
92. Rey E, Garneau P, David M, Gauthier R, Leduc L, Michon N, et al. Dalteparin for the prevention of recurrence of placental-mediated complications of pregnancy in women



without thrombophilia: a pilot randomized controlled trial. *Journal of thrombosis and haemostasis* : JTH. 2009;7(1):58-64.